

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670875

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質の新規機能に着目した口腔癌に対する新たな浸潤・転移制御法の開発

研究課題名(英文) Approach to the mechanism of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma from sphingolipid.

研究代表者

加藤 晃一郎 (KATO, Koichiro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30719373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔原発扁平上皮癌の予後と深く関与する浸潤様式(YK分類)とsphingosin kinase 1(SK1)に関し解析を行った。SK1は腫瘍先進部腫瘍細胞細胞膜とその近傍の反応性間質細胞での発現の局在を認めた。浸潤様式別では、YK-4C, 4D型で高発現を認め、E-cadherin喪失と vimentin発現が誘導されるなど、SK1の扁平上皮癌細胞のepithelial mesenchymal transition (EMT)への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingosin kinase 1 is expressed in the invading squamous cell carcinoma (SCC) cells of the oral cavity. Expression of sphingosin kinase 1 is not related to the differentiation of the tumor cells. Sphingosin kinase 1 is not associated with proliferative activity of SCC of the oral cavity but epithelial-mesenchymal transition (EMT) of SCC cells. It is suggested that Grade 3 and 4C SCC cells require tumor cell-host cell interaction to upregulate SK1, and Grade 4D cells are not dependent on the interaction but able to upregulate SK1 by themselves and exhibit vigorous invading capability.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、診断・治療法の進歩に伴い5年生存率は飛躍的に向上した。しかし、治療抵抗性患者の予後は未だ不良であり、新たな治療薬の開発が切望されている。腺癌では抗癌剤の改良に加え、EGFRのdriving mutationによる活性化チロシンキナーゼや血管増生因子に対する分子標的治療が導入されている。一方、扁平上皮癌に有効な治療法は停滞しており、その浸潤・転移に関わる分子機構の解明とそれに基づいた新規治療法の実現は口腔外科学の重要課題の一つである。これまで水分子細胞膜チャネルであるaquaporin (AQP)の発現が肺扁平上皮癌の進展・予後に関わることが明らかにされており、AQP1は浸潤先進部でのlamellipodia形成を介した移動・浸潤に、AQP5は細胞膜アダプター機能によりMAPK/ERK系やSrc系細胞内セカンドシグナル活性化に関与が示唆されてきた。また、CXCR4の発現亢進は遺伝子発現プロファイリング解析により見いだされた。これら分子群が浸潤能を亢進させるためには、浸潤先進部がん細胞の細胞膜における適切な再分配とそれに引き続きlamellipodia形成に連なる細胞骨格再構成が必須であり、その制御機構の解明が扁平上皮癌に対する新たな進展阻止法の確立に向けた重要な研究課題となった。細胞膜活性脂質sphingolipidの代謝経路でCeramide/sphingosin系のアポトーシス制御への関与はこれまで知られていたが、増殖因子刺激によるHeLa細胞の浸潤能亢進におけるsphingosinリン酸化とその細胞膜受容体S1PRを介するezrin-radixin-moesin(ERM)の活性化による細胞骨格再構成が、またsphingomyelin (SM)の細胞膜脂質ラフト修飾を介したCXCR4再分配と移動能制御への関与が報告された。「Sphingolipidが機能分子の細胞膜での再配分、シグナル伝達集積、細胞骨格再構成を介して、口腔原発扁平上皮癌の移動・浸潤能亢進に寄与するのは？」という仮説に至り、新たな転移制御法確立に向けその検証が必要となった。

2. 研究の目的

がん細胞の特徴は無数の増殖と浸潤・転移能である。増殖性に対する制御に関して、抗癌剤に加え、近年ではdriving mutationやangiogenesisに着目した分子標的治療の実現が精力的に展開されている。一方、浸潤・転移能に関しては、関係する複数の分子経路が明らかにされてきたが、制御法の確立には未だ至っていない。その原因は、浸潤・転移は複数のステップから構成される複雑な現象であり、癌腫の増殖抑制におけるdriving mutationのようにピンポイントで制御可能な点がこれまで明らかでなかったためと考えられる。がん細胞の浸潤・転移に関係する多くの分子は細胞膜あるいはその近傍に存在する。それらが有効に機能するためには単

なる発現亢進だけでなく、細胞膜上での再分配による多量体形成を介した活性化、同部位を中心とした複数の細胞内シグナル伝達の集約、その結果としての細胞局所でのlamellipodia/filopodia形成などの形態変化に必要な細胞骨格の再構成が生じて、はじめて細胞移動や浸潤能亢進に連なる。機能分子の細胞膜上での再分配という浸潤性発育に関わる複数の異なるパスウェイの統合に関わる細胞膜構成成分であるsphingolipid、特にsphingosin系によるERM活性化を介した細胞骨格再構成とsphingomyelin系による脂質ラフト構造の細胞内シグナル集積のプラットフォーム機能に着目して、口腔原発扁平上皮癌の浸潤・転移におけるその役割の解明と新たな制御法の確立を目指すことを目的としている。本研究により細胞膜上での機能分子の再分配、細胞内シグナルの集約と細胞骨格再構成という浸潤・転移に関わる複数のパスウェイの統合点を制御する、脂質ワールドの生物学的に活発なプレーヤーであるsphingolipid系の役割が明らかになり、口腔原発扁平上皮癌の転移を制御する、これまでにない画期的な創薬の実現に連なることが期待される。そして口腔原発扁平上皮癌における知見は、多臓器の扁平上皮癌に対する制御法の確立への応用へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

増殖因子やサイトカインなどでERKを介しSK1は活性化され、スフィンゴシンからスフィンゴシン1リン酸が細胞膜上で産生される。それが固有のトランスポーターにより細胞外に排出され、5種類の特異的受容体によりリガンドとして結合することで、オートクラインおよびパラクライン的に作用することが研究で明らかにされている。腫瘍細胞では、細胞増殖、アポトーシス抑制や細胞移動の亢進機能が明らかにされており、SK1分子の発現を免疫染色にて検討した。口腔原発扁平上皮癌の浸潤・転移における、Sphingomyelin産生と細胞膜上での機能分子の分布、細胞内シグナルの活性化、増殖因子刺激によるSK活性、S1P産生、S1PR発現とERM活性化・lamellipodia形成との関係を、口腔原発の扁平上皮癌組織浸潤先進部での各合成酵素の発現、活性、関連分子群の局在とリン酸化による活性化、lamellipodia形成の解析を口腔原発扁平上皮癌の予後と深く関与するとされる浸潤様式(YK分類)において解析を行った。

4. 研究成果

活性脂質sphingolipidに着目した口腔原発扁平上皮癌の浸潤・転移に対する新たな制御法の確立を目指し、口腔原発扁平上皮癌浸潤先進部におけるsphingosin系の細胞増殖とepithelial mesenchymal transition (EMT)への関与に関し、外科的切除された口腔原発

扁平上皮癌 100 組織と高度・軽度異形成組織 15 例を用い検討し、以下の成績を得た。

(1) 扁平上皮異形成部ならびに扁平上皮癌 膨張性発育部では、SpK-1 の発現が陰性～弱陽性なのに対して、浸潤性扁平上皮癌の浸潤先進部に一致して SpK-1 の発現亢進を認めた。

(2) 浸潤様式 YK1～4D まで系統的に検討した結果、特に YK-4C では索状に浸潤する腫瘍細胞に一致して強い SK1 の発現を認め、YK-4D では浸潤性発育する個々の細胞全体に強い SK1 の発現が認められた。

(3) 浸潤性格の強い口腔原発扁平上皮癌浸潤先進部の反応性間質細胞にも時に SpK-1 の発現が亢進していた。

(4) 口腔原発扁平上皮癌浸潤部における SpK-1 の発現は腫瘍細胞の分化度や Ki67 標識率とは相関せず、浸潤様式別に YK-4C, 4D 型で高発現を認め、E-cadherin の喪失と vimentin 発現と有意な関連を認めた。さらに、YK-3 型と 4C 型では浸潤部反応性間質細胞にも SK1 の発現を認め扁平上皮癌浸潤先進部における癌細胞・宿主細胞関連への関与も示唆された。

以上の所見から、口腔原発扁平上皮癌浸潤先進部では SpK-1 の発現誘導を介した

sphingosin-1-phosphate (S1P) の産生が腫瘍細胞の EMT に深く関わっている可能性が示唆された。興味深いことに YK-4D 型では間質細胞の SK1 発現亢進は認めず、YK-4D 型癌細胞は癌細胞・宿主細胞関連から独立した浸潤能を獲得している可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Effects of oral administration of tripeptides derived from type I collagen (collagen tripeptide) on atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits, Tang, Lihua; Sakai, Yasuo; Ueda, Yoshimichi; Katsuda, Shogo, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 119:558-563, 2015 「査読あり」

2. Age-related changes of mitochondrial transcription factor a expression in rotator cuff degeneration, T. Ichiseki, S. Ueda, Y. Ueda, A. Kaneuji, N. Kawahara, T. Matsumoto, American journal of translational research, 7:2099-2104, 2015 「査読あり」

3. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia, S. Ueda, T. Ichiseki, Y. Yoshitomi, H. Yonekura, Y. Ueda, A. Kaneuji, T. Matsumoto, Medical molecular morphology, 48:69-75, 2015 「査

読あり」

4. Diagnostic performance of diffusion weighted imaging of malignant and benign pulmonary nodules and masses: comparison with positron emission tomography, K. Usuda, M. Sagawa, N. Motono, M. Ueno, M. Tanaka, Y. Machida, S. Maeda, M. Matoba, Y. Kuginuki, M. Taniguchi, H. Tonami, Y. Ueda, T. Sakuma, Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP., 15:4629-4635, 2014 「査読あり」

5. Recurrence and metastasis of lung cancer demonstrate decreased diffusion on diffusion-weighted magnetic resonance imaging, K. Usuda, M. Sagawa, N. Motono, M. Ueno, M. Tanaka, Y. Machida, S. Maeda, M. Matoba, H. Tonami, Y. Ueda, T. Sakuma, Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP., 15:6843-6848, 2014 「査読あり」

6. Relationships between EGFR mutation status of lung cancer and preoperative factors-are they predictive?, K. Usuda, M. Sagawa, N. Motono, M. Ueno, M. Tanaka, Y. Machida, M. Matoba, M. Taniguchi, H. Tonami, Y. Ueda, T. Sakuma, Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP., 15:657-662, 2014 「査読あり」

[学会発表](計 3 件)

1. The longest-lived homozygous familial hypercholesterolemia as genetically-determined mild phenotype: an autopsy case of fh-tonami. M. Wakasa, K. Takeda, A. Motoyama, R. Ishida, H. Akao, Y. Kawai, M. Kitayama, Y. Ueda, K. Kajinami 82nd EAS Congress 20140531 MADRID, SPAIN.

2. 第 39 回(公社)日本口腔外科学会中部地方会学術集会・長野県松本市・2014 年 5 月 17 日・当科における頸部郭清術施行例の臨床的検討・加藤晃一郎, 村井正寛, 瀬上夏樹

3. Diffusion-Weighted magnetic resonance imaging(DWI) signal intensity and distribution represents the amount of cancer. K. Usuda, M. Sagawa, N. Motono, M. Ueno, M. Tanaka, Y. Machida, M. Matoba, Y. Ueda, T. Sakuma. American Thoracic Society International Conference 20140516 San Diego.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~stoma/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 晃一郎 (KATO,Koichiro)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：30719373

(2)研究分担者

上田 善道 (UEDA,Yoshimichi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50271375

(3)連携研究者

岡崎 俊朗 (OKAZAKI,Toshiro)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40233308