

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861730

研究課題名(和文) 口腔癌に発現する新規バイオマーカーRCAS1の機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application for biomarker RCAS1 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

豊嶋 健史 (Toyoshima, Takeshi)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20546569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸部腺癌の標識であるReceptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1)は、癌に集まる免疫細胞に死を誘導することで体内の免疫機構から逃げて生き延び、結果的に癌が大きくなる。このRCAS1が口腔癌のひとつである口腔扁平上皮癌(OSCC)の細胞にも存在することが確認でき、患者さんの体内のOSCCの状態とRCAS1の量に関連がある可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) could induce apoptosis of immune cells for host with cancer, and lead to the growth. As RCAS1 has been expressed on several types of oral squamous (OSCC) cells, this antigen could play a role of biomarker for patients with OSCC.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：RCAS1 口腔扁平上皮癌 膜型 分泌型 アポトーシス

(1) 研究開始当初の背景

癌のバイオマーカーであるRCAS1

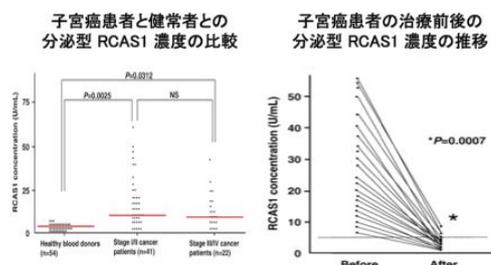
RCAS1は正常組織が癌化するに従って段階的に発現頻度が増加し、子宮頸癌・体癌をはじめ、肺癌、胃癌、口腔癌など15種類の癌の分化度、大きさ、臨床進行期、浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移と有意な相関を示したことから、

RCAS1 の発現が臨床病理因子と相関する癌	
臨床病理因子	癌の種類
分化度	甲状腺癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、乳癌
大きさ	胃癌、子宮頸癌
臨床進行期	食道癌、胆嚢癌、肺癌、子宮体癌
浸潤度	甲状腺癌、食道癌、胃癌、胆嚢癌、子宮体癌
脈管侵襲	胆嚢癌、子宮頸癌
リンパ節転移	食道癌、胃癌、胆嚢癌、肺癌、直腸癌、子宮頸癌

研究協力者の園田らが癌の臨床的予後因子として報告した (Sonoda, et al. Front Biosci. 2008) . また子宮癌患者の血清中では、健常者と比べ高濃度の分泌型RCAS1が検出され、RCAS1値の推移は治療後臨床経過と相関していた (Sonoda, et al. Gynecol Oncol 2006) .

RCAS1のアポトーシス誘導能

1999年にRCAS1が活性化リンパ球にアポトーシスを誘導することが報告された後 (Nakashima, et al. Nature Medicine 1999) , 子宮頸癌でもRCAS1の発現強度に相関して癌周囲のリンパ球 (TIL) のアポトーシスが誘導されることが分かった . そしてFas ligandやTNF- との相関はなかったため、RCAS1単独によるアポトーシス誘導能と結論づけられた . さらに *in vitro* 実験系では、血清中のRCAS1により、RCAS1受容体を持つ白血病細胞株K562



の増殖抑制効果が認められた .

(2) 研究の目的

子宮頸部腺癌細胞株 SiSo から単離された癌関連抗原である Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) は、発現動態として細胞膜表面型と分泌型が存在する . 臨床的には子宮癌のバイオマーカーであり、機能的には、癌周囲のリンパ球にアポトーシスを誘導し免疫監視機構から回避して癌の進展に寄与する . 申請者らは、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の臨床検体での RCAS1 発現を報告したが、OSCC におけるアポトーシス誘導能については基礎的・臨床的に不明であった . そこで本研究では、まず *in vitro* で OSCC 細胞における RCAS1 の発現動態と機能について解析した . 次に、RCAS1 が OSCC のバイオマーカーとして有用であるかを臨床的に検討した .

(3) 研究の方法

RCAS1 の発現動態の検索

癌細胞の性格により RCAS1 の発現動態が異なる可能性があった . また、アポトーシス誘導能を有するのは主に分泌型であることから、4 種類の OSCC 由来細胞による RCAS1 の発現動態を確認することで、後に臨床病理因子との相関を検討する際にヒントとなる可能性がある .

- 用いた OSCC 由来細胞株 : HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B
- 陽性コントロール : 子宮頸部腺癌細胞株 SiSo
- 実験方法 :

それぞれの OSCC 由来細胞を培養皿に付着させた後、4 日間培養を行う . 膜型 RCAS1 の検索は付着完了時に行う . 分泌型 RCAS1 の検索は付着完了時から 1,2,3,4 日後に行う . 方法は以下の通りである .

Flow cytometry 法 : 膜型 RCAS1 の検索 ( 標識抗体 : Alexa488 )

Dot blot 法:分泌型 RCAS1 の検索( 標識抗体 : HRP )

ELISA 法 :分泌型 RCAS1 の検索 ( 標識抗体 : HRP )

RCAS1 によるアポトーシス誘導能の検討  
a) OSCC 由来細胞と K562 の共培養を行い , RCAS1 によるアポトーシス誘導能について検討した .

細胞間接着により誘導される膜型 RCAS1 による K562 に対するアポトーシスを検索した .

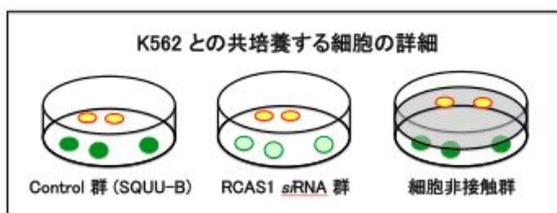
- 用いた OSCC 由来細胞株 : HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B
- 共培養する標的細胞 : RCAS1 受容体を持つ白血病細胞株 K562

● 実験方法 :  
OSCC 由来細胞と K562 を 4 日間 共培養する . K562 のアポトーシスの検索は付着完了時から 1,2,3,4 日後に Flow cytometry 法 ( 標識抗体 : Annexin V-PE ) を用いて行う .

膜型・分泌型 RCAS1 によるアポトーシス誘導能への影響についての検討

まず ,OSCC 由来細胞に siRNA を導入してターゲットである RCAS1 遺伝子をノックダウンして , 膜型および分泌型 RCAS1 の発現が消失することを Flow cytometry 法と ELISA 法で確認した .

次に RCAS1 の発現動態による K562 のアポトーシス誘導能への影響を確認するために以下の 3 群を用意して共培養を行い , 膜型・分泌型 RCAS1 によるアポトーシスの程度を Flow cytometry 法で測定した .



- RCAS1 siRNA 群 : OSCC 細胞中の RCAS1

をノックダウン

- 細胞非接触群 : メンブレンにより OSCC 細胞と K562 の細胞間接触を妨げる
- Control 群 : OSCC 細胞と K562 の共培養

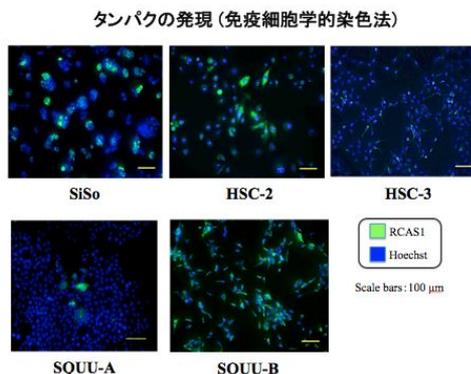
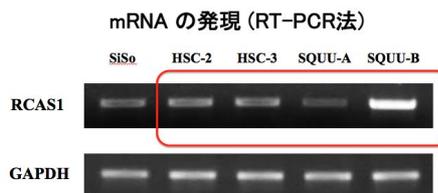
c) OSCC 患者の血清中の RCAS1 値と臨床病理因子および臨床経過との関連を検索した

RCAS1 が OSCC のバイオマーカーとして有用であるかを検討するために , OSCC 患者の末梢血を経時的 ( 術前、術中、術後、定期的な経過観察時 ) に採取し分泌型 RCAS1 値の測定を行い , 臨床病理因子との相関を検討した . また *in vitro* 実験系で , OSCC 患者の血清中の RCAS1 による K562 の増殖抑制効果を確認した .

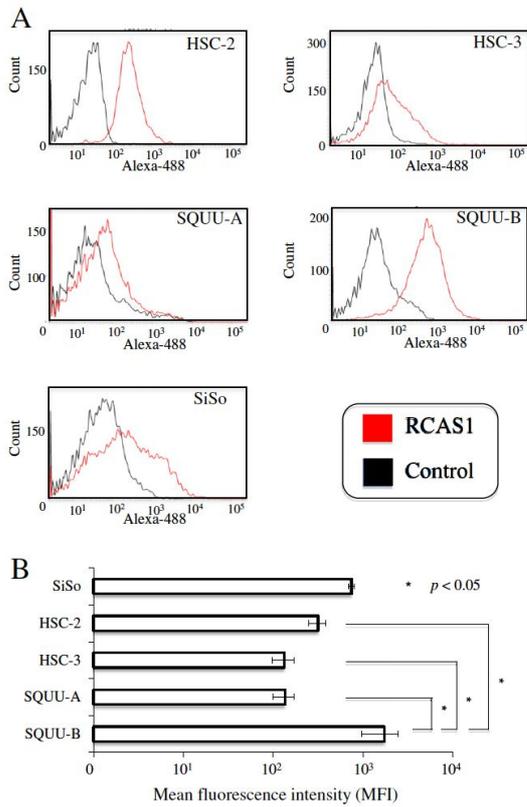
#### (4) 研究成果

OSCC 由来細胞における膜型および分泌型 RCAS1 の発現動態の検索

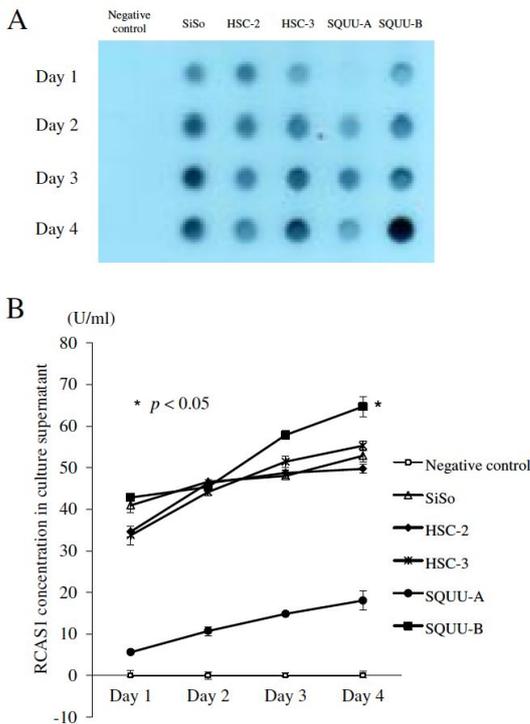
4 種類の OSCC 由来細胞株 ( HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B ) を使用して RCAS1 の検索を行ったところ , 全ての OSCC 細胞株において RCAS1 mRNA およびタンパクを発現していることがわかった .



次に, Flow cytometry 法により, 全ての OSCC 細胞株から膜型 RCAS1 が検出された.

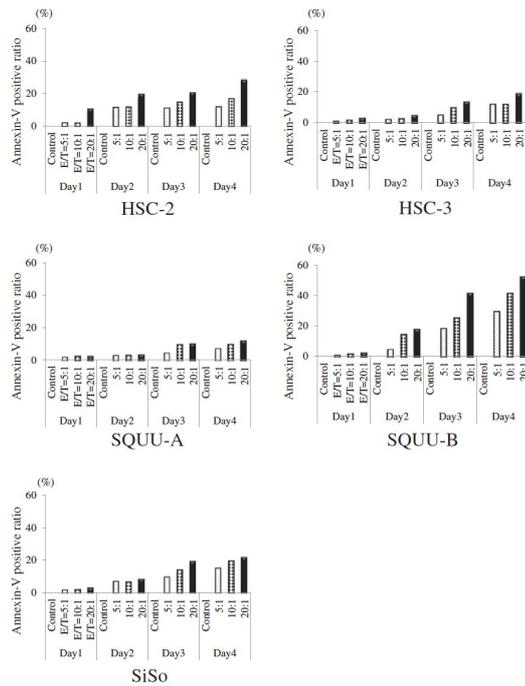


また, Dot blot 法, ELISA 法により, 全ての OSCC 細胞株から分泌型 RCAS1 が検出された.

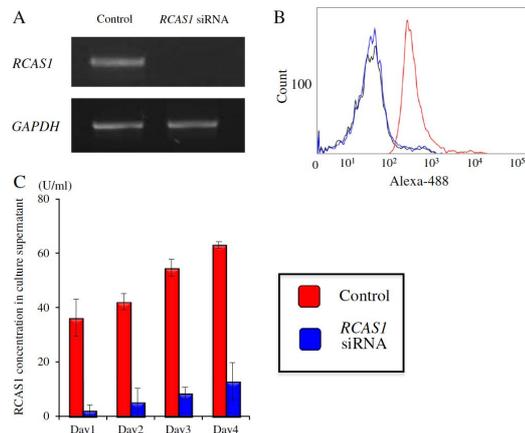


### RCAS1 によるアポトーシス誘導能の検討

細胞間接着により誘導される膜型 RCAS1 による K562 に対するアポトーシスを検索したところ, E/T ratio および培養日数の増加に従って K562 のアポトーシスが誘導された. また, SQUU-B によるアポトーシス誘導が, 他の 3 種類の OSCC 細胞下部によるアポトーシス誘導よりも大きかった.



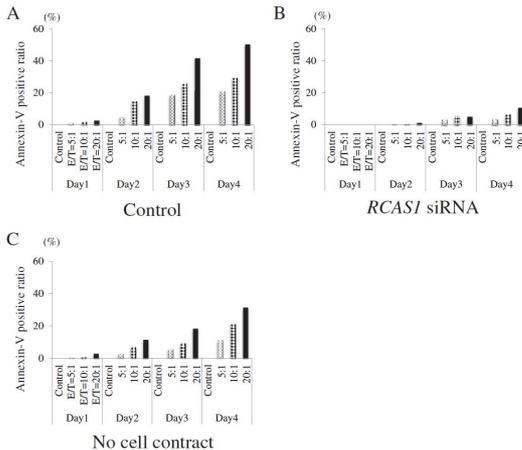
次に, 膜型, 分泌型 RCAS1 がどのようにアポトーシス誘導能に影響するかを検討した.



まず, OSCC 由来細胞に siRNA を導入してターゲットである RCAS1 遺伝子をノックダウンして (A), 膜型および分泌型 RCAS1 の発現が消失することを Flow cytometry 法と ELISA 法

で確認した (B,C)。

次に RCAS1 の発現動態による K562 のアポトーシス誘導能への影響を確認するために膜型、分泌型 RCAS1 によるアポトーシスの程度を Flow cytometry 法で測定した。



SQUU-B と K562 との共培養では、前述の実験結果と同様に、K562 のアポトーシスの誘導が確認された (A)。次に、RCAS1 をノックダウンした RCAS1 siRNA 群では、K562 のアポトーシスが著しく抑制された (B)。また、メンブレンにより SQUU-B と K562 の細胞間接触を妨げた細胞非接触群では、K562 のアポトーシスは認められたもののその程度は低かった。

最後に、RCAS1 が OSCC のバイオマーカーとして有用であるかを検討するために、OSCC 患者の末梢血を経時的 (術前、術中、術後、定期的な経過観察時) に採取し分泌型 RCAS1 値の測定を行った。数例において、術前と比較して、術後の分泌型 RCAS1 値の低下が認められた。現在も症例数を重ねている段階であり、現時点では RCAS1 が OSCC のバイオマーカーとして有用であるかを明言できる結果は得られていない。

#### 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 1 件)

Tanaka H, Toyoshima T, Sonoda K, Kitamura R, Sasaguri M, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Nakamura S. Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma. 査読あり. J Transl Med. 2016;10:102

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 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 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

豊嶋 健史 (TOYOSHIMA TAKESHI)  
九州大学歯学研究院 共同研究員  
研究者番号：20546569

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )