

学位論文の要旨

EP4-Induced Mitochondrial Localization and Cell

Migration Mediated by CALML6

in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

(口腔扁平上皮癌における EP4, CALML6 と

ミトコンドリア動態の解析)

September, 2024

(2024 年 9 月)

Soichiro Ishikawa

石川 聡一郎

Department of Oral & Maxillofacial Surgery
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻
顎顔面口腔機能制御学

(Research Supervisor: Yoshihiro Ishikawa, Professor)
(研究指導教員: 循環制御医学 前主任教授 石川 義弘 教授)

(Doctoral Supervisor: Kenji Mitsudo, Professor)
(指導教員: 顎顔面口腔機能制御学 光藤 健司 教授)

学位論文の要旨

EP4-Induced Mitochondrial Localization and Cell Migration Mediated by CALML6 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

(口腔扁平上皮癌における EP4, CALML6 とミトコンドリア動態の解析)

<https://rdcu.be/dKgNb>

【序論】

口腔がんは、頭頸部で最もよくみられる悪性腫瘍のひとつである。口腔悪性腫瘍の約 90% は扁平上皮癌である。治療の進歩にもかかわらず、予後は依然として悪く、米国での 5 年生存率は約 50% である。頸部リンパ節転移の有無は重要な予後因子である。手術を含む現在の治療法は、しばしば顕著な口腔機能障害を引き起こすため、より効果的で侵襲の少ない治療法の確立が求められている。

一方、プロスタグランジン E2 (PGE2) 受容体のサブタイプである EP4 プロスタノイド受容体は、口腔がんだけでなく他の癌における細胞遊走と転移の制御に極めて重要な役割を果たしている(Yokoyama et al., 2013)。我々の教室では、口腔がんの遊走/転移における Ca^{2+} 制御の新しい経路を同定した。そこでは EP4 が Ca^{2+} チャンネルの一つである *Orai1* を介して細胞外 Ca^{2+} 流入を調節し細胞遊走を調節することを明らかにした(Osawa et al., 2019)。しかしながら、 Ca^{2+} 流入後の下流シグナルの同定は明らかではない。

Ca^{2+} は、様々な細胞内プロセスにおいてセカンドメッセンジャーとして機能している(Berridge et al., 2003)。中でも、カルモジュリン (CaM) は、 Ca^{2+} と結合し Ca^{2+} 関連シグナルを調節することが知られている。しかし、口腔がんにおけるカルモジュリンの役割は不明である。

さらに、細胞内の重要なエネルギー産生源であるミトコンドリアは、癌の進行や転移にも関与している(Scheid et al., 2021)。ミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) は、活性酸素種 (ROS) を生成する。活性酸素は、がん細胞のシグナル伝達や増殖などに重要な役割を果たし、細胞の遊走や浸潤などのプロセスに影響を及ぼす。

今回、我々は口腔がん細胞における EP4 誘導性 Ca^{2+} 流入と下流シグナル伝達、ミトコンドリア生合成との関連について検討した。

【方法】

ヒト歯肉線維芽細胞株 HGnF 及びヒト口腔扁平上皮がん細胞株 HSC-3、レンチウイルスで EP4 を過剰発現した HSC-3 細胞株、shRNA レンチウイルスで CALML6, CaMKK2 をそれぞれノックダウンした HSC-3 細胞株を用いて実験した (遺伝子組換え実験承認番号: F-D-21-60)。薬剤は、ONO-AE1-437 (EP4 agonist), STO-609 (CaMKK2 inhibitor) を使用した。Scratch assay で細胞の遊走能を評価した。さらに EP4 が転移能にも影響があるか調べるために EP4 過剰

発現細胞を使用して動物実験を行った（動物実験承認番号：F-A-22-044）。使用したモデルはリンパ節転移モデルマウスと尾静脈肺転移モデルマウスを使用した。それぞれの転移の評価は緑色蛍光タンパク質（GFP）と *in vivo* イメージングシステム（IVIS）を使用した。

メカニズム解析の実験では、RNA シークエンスを行い、EP4 刺激により変化する遺伝子を網羅的に解析した。Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot 法で EP4 刺激時の遺伝子発現、蛋白質発現の変化を評価した。ミトコンドリア生合成については、フラックスアナライザーを用いて EP4 刺激時のミトコンドリア代謝変化を評価した。

【結果】

まず、先行研究で確認できなかった正常口腔細胞と口腔がん細胞との EP4 発現レベルを確認した。口腔がんにおける EP4 の mRNA 転写産物およびタンパク質の発現レベルは、正常口腔細胞よりも高かった。次に、EP4 と細胞遊走の関連を検討するために口腔がん細胞において EP4 過剰発現細胞を作製した。EP4 過剰発現は、口腔がん細胞の遊走を促進した。さらに、*in vivo* マウスモデルにおいて頸部リンパ節転移も増加した。

EP4 誘導性 Ca²⁺流入と下流シグナル伝達の間を明らかにするために、口腔がん細胞において、EP4 刺激により変化する遺伝子を RNA シークエンスにて網羅的に解析した。その結果、EP4 刺激によりカルシウム関連タンパクの一つである calmodulin-like protein 6 (CALML6) が増加していた。CALML6 は歯肉線維芽細胞と比較し口腔がん細胞に発現が高く、CALML6 をノックダウンすると EP4 刺激で誘導される細胞遊走の亢進が抑制された。

そこで、CALML6 の下流シグナルとして、細胞遊走と関わりのある calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)に着目した。興味深いことに EP4 刺激により、CaMKK2 のリン酸化が亢進した。さらに、CaMKK2 の下流に存在し、CaMKK2 により直接活性化される AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化も亢進した。

EP4 刺激による細胞遊走には、CaMKK2 が AMPK のリン酸化を介して重要な役割を果たしている可能性があるため、CaMKK2 阻害による下流シグナルの伝達と細胞遊走能の変化を調べた。CaMKK2 阻害は、EP4 刺激による AMPK のリン酸化と細胞遊走を抑制した。また、口腔がんの肺転移モデルマウスにおいて、EP4 過剰発現により亢進した肺転移が CaMKK2 阻害薬により有意に抑制された。

最後に、EP4 刺激により活性化した AMPK がミトコンドリア生合成に関係しているか検討した。EP4 刺激は、口腔がん細胞において Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)を介して、ミトコンドリア生合成を増加させた。

これらのことから、EP4 による細胞遊走メカニズムとして CALML6 と CaMKK2 を介してミトコンドリア生合成を調節していることが明らかになった。

【考察】

EP4 が乳がんなどにおいて細胞遊走や転移の増加と相関があることが知られているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、EP4 が CALML6 と CaMKK2 を介してミトコンドリア生合成を調節し細胞遊走を亢進することを実証した。この報告は、他の癌腫や正常細胞においても報告がなく、今後のがん治療の新たなターゲットとなることが考えられる。特に、CALML6 については哺乳類においてその役割がほとんど未解明であり、今後はさらなるメカニズムの解明と臨床応用を目的として研究を進めていく。

【結語】

口腔がんの進行における CALML6 と EP4/CALML6/CaMKK2/AMPK シグナル伝達経路の重要性を再確認し、がん細胞の移動におけるこれらの役割の包括的な概観を提供し、口腔がん治療の潜在的な標的であることを示唆している。これらの分子と経路の詳細な探求は、口腔がんの遊走・転移メカニズムを解明し、より効果的な治療法を開発することを目的とした今後の研究の基礎を築くものである。

キーワード：EP4, 遊走, カルシウム, 口腔がん, ミトコンドリア

引用文献

Berridge, MJ., Bootman, MD., Roderick, HL. (2003), Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-529.

Osawa, K., Umemura, M., Nakakaji, R., Tanaka, R., Islam, RM., Nagasako, A., Fujita, T., Yokoyama, U., Koizumi, T., Mitsudo, K., Ishikawa, Y. (2019), Prostaglandin E2 receptor EP4 regulates cell migration through Orail, *Cancer Science*, 111, 160-174.

Scheid, AD., Beadnell, TC., Welch, DR. (2021), Roles of mitochondria in the hallmarks of metastasis. *Br J Cancer* , 124, 124-135.

Yokoyama, U., Iwatsubo, K., Umemura, M., Fujita, T., Ishikawa, Y. (2013), The Prostanoid EP4 Receptor and Its Signaling Pathway, *Pharmacological Reviews*, 65, 1010-1052.

論文目録

I 主論文

EP4-induced mitochondrial localization and cell migration mediated by CALML6 in human oral squamous cell carcinoma

Ishikawa S, Umemura M, Nakakaji R, Nagasako A, Nagao K, Mizuno Y, Sugiura K, Kioi M, Mitsudo K, Ishikawa K

Commun Biol, 7(567), 2024

II 副論文

なし

III 参考論文

英文

1. Limitation of PET/CT for screening of synchronous upper gastrointestinal cancer in oral cancer patients
Iwai T, Ishikawa S, Ideta Y, Sugiyama S, Hayashi Y, Minamiyama S, Kitajima H, Mitsudo K.
Oral Maxillofa Surg, 36(2), 191-194, 2024.
2. Sublingual Gland Herniation Masquerading as Submandibular Lesion
Iwai T, Sugiyama S, Ishikawa S, Mitsudo K.
Indian J Surg, 85(2), 438-439, 2023.
3. A submandibular mass with cystic component
Ishikawa S, Iwai T, Sugiyama S, Hirota M, Mitsudo K.
Ear Nose Throat J, 014556132210741, 2022.
4. Submandibular gland venous malformation with multiple phleboliths
Ishikawa S, Iwai T, Sugiyama S, Ohashi N, Kitajima H, Hirota M, Yamanaka S, Mitsudo K.
Oral Maxillofa Surg, 33(2), 183-187, 2021.

和文

1. ナビゲーションシステムを用いて摘出した上顎歯原性角化嚢胞再発症例
矢谷実英, 岩井俊憲, 杉山聡美, 石川聡一郎, 出田ゆか, 吉井悠, 南山周平, 矢島康治, 馬場隼一, 小栗千里, 光藤健司.
横浜医学, 74(2), 43-47, 2023.
2. ナビゲーションシステムと二分割サージカルガイドを用いて骨削除術を行った下顎骨線維性異形成症の1例
矢島 康治, 岩井 俊憲, 本田 康二, 杉山 聡美, 石川 聡一郎, 出田 ゆか,
矢谷 実英, 南山 周平, 馬場 隼一, 大橋 伸英, 片岡 俊朗, 藤井 誠志, 光藤 健司.
横浜医学, 73(2), 47-53, 2022.
3. 成人に生じた顎下部リンパ管奇形の1例
南山周平, 岩井俊憲, 杉山聡美, 石川聡一郎, 出田ゆか, 吉井 悠, 矢島康治,
馬場隼一, 小栗千里, 光藤健司
日口診誌, 35(1), 29-34, 2022.
4. 舌部分切除後の舌前方欠損に対して sliding tongue flap を用いて再建した1例
竹田 敦, 岩井 俊憲, 杉山 聡美, 出田 ゆか, 石川 聡一郎, 光藤 健司
日口科誌, 67(6), 399-403, 2021.
5. 市販医薬品の薬効成分を磁性化する画期的技術の開発
梅村 将就, 中鍛治 里奈, 永迫 茜, Md Rafikul Islam, 大竹 誠, 長尾 景充,
根本 寛子, 水野 雄斗, 石川 聡一郎, 鈴木 文菜, 石川義弘.
横浜医学, 72(4), 537-544, 2021.