

## 機械受容器TRPV4は口腔扁平上皮癌細胞の増殖を促進する : Ca<sup>2+</sup>/CaMKII/AKTシグナル伝達を介して

田尻, 祐大

<https://hdl.handle.net/2324/4475041>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

機械受容器 **TRPV4** は口腔扁平上皮癌細胞の  
増殖を促進する  
～**Ca<sup>2+</sup>/CaMKII/AKT** シグナル伝達を介して～

2021年3月

九州大学大学院歯学府  
口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野  
田尻 祐大

九州大学大学院歯学研究院  
口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野  
指導教員: 清島 保 教授

本研究は下記雑誌に投稿し掲載された。

**The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation.**

Shinsuke Fujii, Yudai Tajiri, Kana Hasegawa, Shinji Matsumoto, Reiko U. Yoshimoto, Hiroko Wada, Shosei Kishida, Mizuho A. Kido, Hiromasa Yoshikawa, Satoru Ozeki and Tamotsu Kiyoshima

This paper was published by Laboratory Investigation. 2020 Feb; 100 (2): 311-323.

また、本文の内容の一部は下記の学会において発表した。

2018年9月 第60回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表  
タイトル ヒト口腔癌における TRPV4 の発現と機能解析

2020年7月 第109回日本病理学会総会 口演発表  
タイトル 機械受容器 TRPV4 は口腔扁平上皮癌の細胞増殖を促進する

2020年9月 第62回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表 モリタ優秀発表賞  
タイトル ヒト口腔扁平上皮癌に高発現した機械受容器 TRPV4 は  
CaMKII/AKT シグナル伝達を介して癌細胞の増殖を制御する

2020年11月 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会 ポスター発表  
タイトル TRPV4 はヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を制御する

2021年1月 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 ポスター発表予定  
タイトル TRPV4 は CaMKII/AKT シグナル伝達を介してヒト口腔扁平上皮癌  
細胞の増殖を制御する

また、下記論文の共著者として研究を行った。

**YAP signaling induces PIEZO1 expression to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation.**

Kana Hasegawa, Shinsuke Fujii, Shinji Matsumoto, Yudai Tajiri, Akira Kikuchi and Tamotsu Kiyoshima

This paper was published by The Journal of Pathology. 2021 Jan; 253 (1): 80-93.

## 略語一覧

$\alpha$ -MEM: alpha modified Eagle minimum essential medium  
BSA: bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)  
CaM: calmodulin  
CaMK: calmodulin kinase  
cDNA: complementary DNA (相補的 DNA)  
DAB: 3,3'-diaminobenzidine (ジアミノベンジジン)  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
ECM: extracellular matrix (細胞外マトリックス)  
FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)  
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
HE: hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン-エオジン)  
HRP: horseradish peroxidase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide  
ICC: immunocytochemistry (免疫細胞化学染色)  
IHC: immunohistochemistry (免疫組織化学染色)  
KD: knock down  
mRNA: messenger RNA  
n.s.: not significant  
ORF: open reading frame  
OSCC: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)  
PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)  
PCR: polymerase chain reaction  
PFA: paraformaldehyde  
PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase  
PIK3CA: phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha  
RT: room temperature  
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
shRNA: small hairpin RNA  
siRNA: small interfering RNA  
TRP: transient receptor potential  
TRPV4: transient receptor potential vanilloid 4  
UTR: untranslated region  
WB: western blotting  
X293T: Lenti-X™ 293T

# 目 次

1. 要 旨 .....	1
2. 緒 言 .....	3
3. 材料と方法 .....	5
4. 結 果 .....	15
4-1. OSCC 細胞株は TRPV4 を発現している .....	15
TRPV4 はアゴニスト依存的に Ca <sup>2+</sup> チャネルとして機能している	
TRPV4 はアゴニスト非存在下にて Ca <sup>2+</sup> チャネルとして機能している	
4-2. TRPV4 の発現は OSCC 細胞増殖を正に制御する .....	22
TRPV4 の発現は OSCC 細胞遊走を正に制御する	
4-3. TRPV4 を介した Ca <sup>2+</sup> 細胞内流入は OSCC 細胞増殖を正に制御する .....	25
4-4. TRPV4 の発現は AKT を活性化する .....	27
4-5. TRPV4 の発現は CaMKII の活性化を介して	
OSCC 細胞増殖を促進する .....	29
4-6. TRPV4 の下流で CaMKII/AKT が活性化し	
OSCC 細胞増殖を促進する .....	31
4-7. 内因性 TRPV4 は CaMKII/AKT を活性化し	
OSCC 細胞増殖を促進する .....	33
4-8. TRPV4 は細胞外環境を感知し OSCC 細胞増殖を制御する .....	37
4-9. <i>in vivo</i> において TRPV4 は腫瘍形成に関与する .....	43
4-10. TRPV4 はヒト OSCC において発現している .....	46
5. 考 察 .....	54
6. 謝 辞 .....	57
7. 参考文献 .....	58

# 1. 要 旨

口腔癌の多くは、上皮由来の口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）であり、OSCC は基底膜を破壊して間質へと浸潤し、細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）と接する。また、最近の研究では、ECM の硬さが増加すると、腫瘍細胞の増殖能や遊走能が増加することが示されており、腫瘍形成において極めて重要な影響を与えると考えられる。

transient receptor potential vanilloid 4（TRPV4）は  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルで、物理刺激や化学刺激を感知する受容器であり、乳癌や胃癌などで、腫瘍形成を制御することについて報告されている。一方、OSCC における TRPV4 の発現と機能は不明である。本研究では、OSCC における TRPV4 の発現と機能を検討し、その分子基盤を明らかにすることを目的とした。

まず、TRPV4 は正常口腔扁平上皮細胞株と比較して、複数の OSCC 細胞株で高く発現しており、TRPV4 アゴニストで刺激すると TRPV4 の発現量に相関して  $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内に流入した。また、TRPV4 を発現している OSCC 細胞株において siRNA を用いて TRPV4 をノックダウン（knock down: KD）すると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が減少したことから、内因性 TRPV4 の発現が  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルとして機能していると考えられた。さらに、TRPV4 を KD すると、OSCC 細胞株の細胞増殖能と細胞遊走能が低下した。加えて、細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$ をキレートすると、細胞増殖能が低下した。その程度は siRNA を用いて TRPV4 を KD した場合や、siRNA を用いた TRPV4 の KD とキレート剤を併用した場合と同程度であったこと、また、TRPV4 を KD した OSCC 細胞株に TRPV4 を過剰発現すると、これらの抑制効果が解除されたことから、内因性 TRPV4 の発現が細胞増殖を制御するのに十分であると考えられた。そこで、TRPV4 の下流シグナルについて検討した

ところ、TRPV4 の KD は、Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin 依存性プロテインキナーゼ II (calmodulin kinase II: CaMKII) と AKT のリン酸化を抑制した。また、shRNA を用いて TRPV4 を恒常的に KD したところ、低接着培養と 2D 培養では増殖能に有意差は認められなかったが、3D 培養における腫瘍細胞塊の大きさと増殖能は減少した。これらのことから、TRPV4 は ECM の硬さを含めた細胞外環境を感知して増殖を制御していると考えられた。

さらに、ヌードマウスを用いたゼノグラフトモデルにて、shRNA を用いて TRPV4 を恒常的に KD すると、腫瘍細胞増殖と AKT のリン酸化が抑制されたことから、TRPV4 の発現は *in vivo* における腫瘍細胞増殖に必要であった。加えて、OSCC 患者 36 例から得られた病理組織標本を免疫組織化学染色にて検討したところ、TRPV4 が非腫瘍部では発現が少なかったのに対し、腫瘍部では細胞膜と細胞質により多く発現しており、TRPV4 の発現を示す細胞には AKT のリン酸化が高頻度に認められた。

本研究の結果から、TRPV4 を介した Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が CaMKII の活性化を介して AKT シグナル伝達を活性化することで、OSCC の細胞増殖が促進されることが示唆された。このことは、細胞外環境を OSCC の腫瘍細胞が認識し、細胞増殖を制御する機構の一端を見出したと考えられた。

## 2. 緒 言

口腔における悪性腫瘍の 90%以上が口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) である [1]。口腔癌の臨床症状として、疼痛、発赤、びらん、潰瘍、硬結などが挙げられる。これらの中でも、固形癌では一般的に癌周囲に硬結を触知するが、口腔癌では特に、診察時に触診できる硬結が臨床診断において重要な指標の一つにも挙げられる。口腔癌は、口腔咽頭部を含めると、世界で 6 番目に多い癌であり [2]、早期症例 (Stage I, II) の 5 年生存率は 80~90% であるのに対し、進行症例 (Stage III, IV) では 20~30% に減少する [3, 4]。一方で、世界で 4 番目に多い胃癌では、日本において診断や治療技術の向上により、進行症例も含めた切除可能症例の 5 年生存率は 70% に達する [5, 6]。口腔癌においても治療成績を改善するためには、早期発見による早期診断を行い、外科的切除、放射線療法、化学療法などの治療法単独もしくはそれらを組み合わせた集学的治療が重要となる。

正常細胞と腫瘍細胞はともに、隣接細胞や細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) などの細胞外環境に囲まれており、ECM は細胞に対して多様な生物学的影響を与えることが知られている [7]。また、ECM の硬さの増加による腫瘍微小環境の変化が腫瘍形成に与える影響について、様々な研究結果が報告されている。例えば、乳癌や肝細胞癌のマウス腫瘍モデルを用いた研究では、腫瘍周囲の ECM の硬さの増加が、 $\beta 1$  integrin-FAK シグナル伝達、または RHOA-AKT-p300 シグナル伝達などの細胞内シグナル伝達の活性化を介して、腫瘍形成を促進することが示されている [8, 9]。さらに最近の研究では、イオンチャネルや Hippo 経路などの新しいシグナル伝達分子が細胞外環境に応答し、細胞

活動を制御することが明らかにされた [10, 11]。しかし、OSCCにおいて細胞外環境の生物学的機能や腫瘍形成に与える影響に関しては不明である。

transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) は、transient receptor potential (TRP) スーパーファミリーに属する分子量 91 kDa の  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルで [12]、機械刺激 [13, 14]、熱刺激 [15] および浸透圧変化を受容する [16]。最近、TRPV4 が胃癌 [17, 18] や肝細胞癌 [19] の腫瘍形成に関与することが報告されたが、腫瘍形成における TRPV4 の分子基盤は不明である。加えて、TRPV4 シグナル伝達が細胞増殖や細胞遊走などの OSCC 腫瘍形成に与える影響も不明である。

本研究では、OSCC 細胞株とヒト OSCC 病理組織標本における TRPV4 の発現を検討し、TRPV4 が *in vitro* と *in vivo* での OSCC 細胞増殖を制御するメカニズムについて検討した。

### 3. 材料と方法

#### 1. 細胞株、2D 培養

本研究では、ヒト OSCC 由来の細胞株である SAS (低分化型舌癌由来; 低転移株)、HSC-2 (高分化型口底癌由来; 低転移株)、HSC-3 (低分化型舌癌由来; 低転移株)、HSC-4 (高分化型舌癌由来; 低転移株) (Japanese Cancer Research Resources Bank) および SQUU-B (舌癌由来; 高転移株) [20]、ヒト正常口腔上皮細胞株 MOE1a [21]、Lenti-X™ 293T (X293T) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 細胞株を用いた。細胞培養の培地として、HSC-2、HSC-3 および HSC-4 は alpha modified Eagle minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、SAS と SQUU-B は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (Invitrogen)、MOE1a は Defined Keratinocyte-SFM (Invitrogen) を用いた。それぞれの培地には、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen)、100 IU/ml penicillin (Invitrogen)、100 mg/ml streptomycin (Invitrogen) を添加した。X293T の培養では、DMEM (Invitrogen) に 10% FBS、100 IU/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin を添加した。全ての細胞株は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### 2. 使用試薬

TRPV4 選択的アゴニストである GSK1016790A、細胞内/細胞外 Ca<sup>2+</sup>キレート剤である 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-n,n',n',n'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM) と ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-n,n',n',n'-tetraacetic acid (EGTA) は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) の製品を用いた。TRPV4 選択的アンタゴニストである GSK2193874 は TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) の製品を用いた。Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin

依存性プロテインキナーゼ II (calmodulin kinase II: CaMKII) 阻害剤 XII と AKT 阻害剤 VIII は Merck Millipore (Tokyo, Japan) の製品を、CaMKII 阻害剤である Arcyriaflavin A は TOCRIS Bioscience の製品を用いた。western blotting (WB) と免疫組織化学染色で用いた抗 TRPV4 ポリクローナル抗体は、マウス TRPV4 のアミノ酸残基 (N 末端-CDGHQQGYAPKWRTDDAPL-C 末端) と同じ合成ペプチドを、モルモットに免疫することで作製されたものを用いた [22]。

### 3. 低接着培養

細胞低接着 96 well プレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いた。HSC-4 ( $1 \times 10^4$  cells/well) を 5 日間培養し、得られた腫瘍細胞塊を共焦点レーザー顕微鏡 (C2si<sup>+</sup>, NIKON, Tokyo, Japan) で観察し体積を計測した。

### 4. 3D 培養

マトリゲル (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いた。24 well マルチプレート (Corning Costar #3442, Corning, Corning, NY, USA) のウェル内に、径 15 mm 丸カバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) を入れ、40  $\mu$ l のマトリゲルを注入し、37°C で 30 分間インキュベートしてマトリゲルを重合させた。10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM に懸濁した HSC-4 ( $4 \times 10^4$  cells) にマトリゲル (最終濃度 2%) を混和し、先に重合させたマトリゲル上に重積させ、5 日間培養した。形成された腫瘍細胞塊を抗 Ki-67 抗体 (Abcam, Tokyo, Japan)、phalloidin (Invitrogen) および Hoechst 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) で染色した。得られた腫瘍細胞塊を共焦点レーザー顕微鏡 (C2si<sup>+</sup>) で観察し、体積を計測した。

## 5. 細胞遊走実験

組織培養処理された改良型 Boyden チャンバー（直径 6.5 mm、フィルターの厚さ 10  $\mu\text{m}$ 、孔径 8  $\mu\text{m}$ ）（Corning Costar Transwell, Corning, Corning, NY, USA）を用いた。フィルターの下面を 10  $\mu\text{g/ml}$  の I 型コラーゲン（Corning）で 2 時間コーティングし、無血清 DMEM に懸濁した HSC-4 と SAS ( $2.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ ) を上部チャンバーに播種した。細胞を 37°C で 4~8 時間培養し、フィルター下面に移動した細胞を phosphate-buffered saline (PBS) 緩衝 4% paraformaldehyde (PFA)（Merck, Darmstadt, Germany）で固定し、計測した。

## 6. small interfering RNA (siRNA) の導入

TRPV4 siRNA（最終濃度 20 nM）を作製（表 1）し、Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen）と Opti-MEM（Invitrogen）を用いて HSC-4 と SAS に導入した。siRNA を導入して 48 時間後に解析に用いた [23, 24]。

表 1: 使用した siRNA の標的配列

siRNAs	塩基配列
control	5'-CAGTCGCGTTTGC GACTGG-3'
TRPV4 #1	5'-GCTTCTCTGCCCACTCATT-3'
TRPV4 #2	5'-GCTCCTATGGAGTCACATA-3'

## 7. quantitative real-time PCR

total RNA 精製には SV Total RNA Isolation system (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。その後、精製した RNA を SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写した。解析には Thermal cycler Dice® Real

Time System (Takara) を使用し、反応液には SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) とそれぞれの因子の特異的なプライマーを用いた (表 2)。mRNA 発現量を定量化するために、内在性遺伝子の基準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて補正し、 $\Delta\Delta C_t$  法により相対発現量を算出した。

表 2: quantitative real-time PCR に使用したプライマー

mRNA		プライマーの塩基配列
GAPDH	forward	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	reverse	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'
TRPV4 (ORF)	forward	5'-GACGGGGACCTATAGCATCA-3'
	reverse	5'-AACAGGTCCAGGAGGAAGGT-3'
TRPV4 (3'-UTR)	forward	5'-TTCTAGTCCAGCCGCATTTTC-3'
	reverse	5'-CGTTGGCTTATGTGACTCCA-3'

## 8. タンパク質の抽出

細胞を PBS にて洗浄後、lysis buffer (RIPA buffer [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], 2% Protease Inhibitor Cocktail [Sigma-Aldrich], 20  $\mu$ M Lactacystin [Sigma-Aldrich], 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate [Sigma-Aldrich], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF, Wako], 1 mM  $\text{Na}_4\text{VO}_3$  [Sigma-Aldrich]) を加え、細胞溶解液を遠心して上清を回収した。解析には 95°C、5 分の熱変性処理を加えて用いた。

## 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) と western blotting

1 レーンにつき 10 または 20  $\mu$ g 相当量の熱変性処理した細胞溶解液を、8% または 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (30 mA, 60 分間) し、ニトロセルロースメンブレン (Amersham Protran NC, GE Healthcare Life Sciences,

Fairfield, CA, USA) に転写 (105 V, 70 分間) した。その後、5% スキムミルクを室温で 60 分間反応させて抗体の非特異的吸着防止処理を行い、washing buffer (1 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 0.05% Tween20 [TBS-T]) で洗浄し、一次抗体 (表 3) を 4°C で一晩反応させた。TBS-T で洗浄後、二次抗体を室温で 60 分間反応させた。最後に TBS-T で洗浄後、反応には enhanced chemiluminescence (ECL または ECL prime) (GE Healthcare Life Sciences) を使用し、冷却 CCD カメラ (LAS-4000, GE Healthcare Life Sciences) で検出した。なお、陽性対照として  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich) を用いた。

表 3: western blotting (WB) で使用した抗体

抗体 (製造会社)	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human phospho-AKT antibody (4060S, Cell Signaling Technology)	1:3000
monoclonal rabbit anti-human pan-AKT antibody (4691S, Cell Signaling Technology)	1:3000
monoclonal rabbit anti-human phospho-CaMKII antibody (12716S, Cell Signaling Technology)	1:1000
polyclonal rabbit anti-human pan-CaMKII antibodies (3362S, Cell Signaling Technology)	1:1000
polyclonal guinea pig anti-human TRPV4 antibodies	1:1000
monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibody (A5441, Sigma-Aldrich)	1:5000

## 10. レンチウイルスを用いた遺伝子導入

human TRPV4 過剰発現細胞株を作製するため、富永真琴 教授 (Okazaki Institute for Integrative Bioscience [National Institute for Physiological Sciences], Okazaki, Japan) より供与された pcDNA3.1/human TRPV4 [25] の human TRPV4 coding region を、三好浩之 博士 (RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan)

から供与された CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd ベクターに組み換えた [26]。また、下記 (表 4) の配列を標的配列とする shRNA を含むレンチウイルスベクターを構築するために、H1 プロモーターと shRNA を含む DNA フラグメントを、Gateway テクノロジー (Invitrogen) を用いて CS-RfA-EVBsd に導入した。次に、pCAG-HIV-gp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev をパッケージングベクターとし、Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) を用いて X293T へ遺伝子導入し、レンチウイルスを産生させた。

作製したレンチウイルスを用いた遺伝子導入は次の通り行った。HSC-4 を 12 well プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well 播種し、24 時間後に X293T で産生したレンチウイルスの上清と、10  $\mu\text{g/ml}$  の polybrene を加え、HSC-4 へ感染させた。感染させた HSC-4 を  $1080 \times g$  で 1 時間遠心し、24 時間インキュベート後、再播種した。5  $\mu\text{g/ml}$  の blasticidin S (Wako) 存在下にて選択培養し、TRPV4 過剰発現細胞株と TRPV4 shRNA を恒常的に発現する細胞株を樹立した [27, 28]。

表 4: TRPV4 shRNA 作製に使用した標的配列

shRNA	塩基配列
TRPV4	5'-GCTTCTCTGCCCACTCATT-3'

## 11. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の測定

アゴニスト刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  細胞内流入を調べるために、HSC-4 と SAS にカルシウムキット Fluo-4 AM (FUJIFILM Wako) を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間作用させた。その後、FlexStation<sup>®</sup> 3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Tokyo, Japan) の Flex 読み取りモードを用いて、アゴニスト添加前、添加中および添加後の 5 分間を 485 nm 励起波長/525 nm 蛍光波長にて 2 秒ごとに蛍光強度を測定した。

また、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を調べるため、HSC-4 と SAS に  $8 \mu\text{M}$  の Oregon Green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1 AM (OGB-1) (Invitrogen) を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間作用させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (C2si<sup>+</sup>) を用いて観察を行なった。

## 12. 免疫細胞化学染色

HSC-4 を RT で 30 分間、PBS 緩衝 4% PFA で固定した。その後、0.5% Triton X-100 (Wako) と 40 mg/ml bovine serum albumin (BSA, fraction V) (Wako) を含む PBS で、30 分間細胞膜の浸透化処理と抗体の非特異的吸着防止処理を行った。PBS で洗浄後、0.2% Triton X-100 含有 PBS と 0.2% BSA 含有 PBS を用いて、RT で 10 分間、細胞膜の浸透化処理を行い、さらに、0.2% BSA 含有 PBS を RT で 30 分間反応させ、抗体の非特異的吸着防止処理を行った。製造元のプロトコル (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA) に従って、細胞を一次抗体 (表 5) にて RT で 3 時間反応させ、次に二次抗体を RT で 3 時間反応させた。その後、核染色を Hoechst 33342 を用いて RT で 15 分間、細胞骨格 (F-actin) の染色を phalloidin を用いて RT で 2 時間行い、共焦点レーザー顕微鏡 (C2si<sup>+</sup>) にて観察を行った。

表 5: 免疫細胞化学染色 (ICC) で使用した一次抗体

抗体 (製造会社)	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human Ki-67 antibody (ab15580, Abcam)	1:300

### 13. ゼノグラフトモデル（異種移植腫瘍モデル）

BALB/cAnNCrj-nu ノードマウス（雄、5 週齢）（Charles River Laboratory Japan Inc., Osaka, Japan）を、medetomidine（0.3 mg/kg）と midazolam（4 mg/kg）を投与し麻酔した。その後、100  $\mu$ l の PBS で懸濁した HSC-4（ $5 \times 10^7$  cells）を背部に皮下注射した [29]。移植後 14 日目に屠殺し、移植した細胞を含む領域を摘出、体積と重量を測定後、免疫組織化学染色にて検討を行った。腫瘍体積は、（長軸） $\times$ （短軸） $\times$ （短軸） $\times$  0.5 の計算式を用いて算出した [29]。この研究の動物実験に使用されたプロトコルは、九州大学動物実験委員会によって承認された（No. A29-279-1）。摘出した HSC-4 に由来する異種移植腫瘍を PBS 緩衝 4% PFA で固定し、パラフィン包埋した。5  $\mu$ m に薄切し組織標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン（hematoxylin and eosin: HE）染色と、Ki-67 と pAKT の免疫組織化学染色を行った。Decloaking Chamber（Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA）を用いて Target Retrieval Solution（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）にて抗原賦活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性は、1% 過酸化水素水（hydrogen peroxide:  $H_2O_2$ ）（Wako）含有メタノール（Wako）で 30 分間の処理にて除去した。10% ヤギ正常血清（Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan）で 30 分間処理し、抗体の非特異的吸着防止処理を行った後、各一次抗体（表 6）を 4°C で一晩反応させた。二次抗体（Histofine Simple Stain MAX PO, Nichirei）は RT で 1 時間反応させた。3,3'-ジアミノベンジジン（3,3'-diaminobenzidine: DAB）（Nichirei）を用いて発色させた。最後に、ヘマトキシリンで対比染色し、Ki-67 陽性細胞数とヘマトキシリン核染色細胞数を計測した [29]。

表 6: 異種移植腫瘍の免疫組織化学染色 (IHC) で使用した一次抗体

抗体 (製造会社)	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human Ki-67 antibody (ab15580, Abcam)	1:300
monoclonal rabbit anti-human phospho-AKT antibody (4060S, Cell Signaling Technology)	1:100

#### 14. 対象患者の生検標本に対する免疫組織化学染色

本研究に用いた生検病理組織標本は、2013 年 1 月から 2018 年 12 月までの間に、九州医療センター歯科口腔外科を受診し、生検にて病理組織学的に OSCC と診断された 36 例 (男性: 24 例、女性: 12 例、平均年齢: 70 歳 <37~94 歳 >) から得られた (九州医療センター倫理審査委員会承認番号: # 17c006)。OSCC 患者より採取した生検標本は、10%中性緩衝ホルマリン液 (Yuaikasei, Hyogo, Japan) に 24~48 時間浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。4  $\mu$ m の組織標本作製し、HE 染色と免疫組織化学染色を行った。OSCC の組織学的悪性度分類として、grade 分類 (WHO) [1]、腫瘍の大きさは T 分類 (UICC) [30] を使用した。

免疫組織化学染色は、以下の通り行った。作製したパラフィン切片をキシレン (Wako) で脱パラフィン処理、エタノールで水和処理を行い、Decloaking Chamber (Biocare Medical) を用いて Target Retrieval Solution (Agilent Technologies) にて抗原賦活化処理を行い、10 分間 RT で放冷した。その後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するため、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール (Wako) を室温で 30 分間反応させた。さらに 10%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬 II: Nichirei Bioscience) を 30 分間反応させ、抗体の非特異的吸着防止処理を行なった。各一次抗体 (表 7) と 4°C で一晩反応させた。二次抗体 (TRPV4: anti-guinea pig

biotin-conjugated IgG, Jackson ImmunoResearch Inc., pAKT: Histofine Simple Stain MAX PO) を RT で 1 時間反応させた。さらに、TRPV4 はペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 結合ストレプトアビジンと RT で 1 時間反応させた。いずれの抗体反応も DAB を用いて可視化させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った [24,31]。標本内における腫瘍総面積の 20% を超える領域に染色性を示した場合、発現陽性と定義した。

表 7: 免疫組織化学染色 (IHC) に使用した一次抗体

抗体 (製造会社)	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human phospho-AKT antibody (4060S, Cell Signaling Technology)	1:100
polyclonal guinea pig anti-human TRPV4 antibodies	1:100

## 15. 統計学的解析

図 24 と表 8 の統計処理には、JMP<sup>®</sup> Pro 11 ソフトウェア (version 2) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて Fisher の正確確率検定を用いた。その他の実験には Wilcoxon の順位和検定を用いた。 $p < 0.01$  をもって統計学的に有意差ありとした。

## 4. 結 果

### 4-1. OSCC 細胞株は TRPV4 を発現している

ヒト OSCC 細胞における *TRPV4* mRNA 発現量を調べるために、5 種類の OSCC 細胞株 (SAS、HSC-2、HSC-3、HSC-4、SQUU-B) を用いた。また、ヒト正常口腔上皮細胞株である MOE1a をコントロールとして用いた (図 1A)。いずれの OSCC 細胞株も MOE1a と比較して *TRPV4* mRNA を高く発現していたが、特に HSC-4 と SAS に高く発現していた (図 1A)。この結果より、以下の実験では HSC-4 と SAS を用いた。まず、HSC-4 に選択的 TRPV4 アゴニストである GSK1016790A を作用させると、濃度と時間依存的に  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入が増加した (図 1B)。同様に、SAS においても GSK1016790A の濃度と時間依存的な  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入を認めたが、その流入増加は HSC-4 よりも低かった (図 1C)。以上の結果から、OSCC 細胞株に TRPV4 は発現しており、アゴニスト刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入は *TRPV4* の発現量に依存すると考えられた。

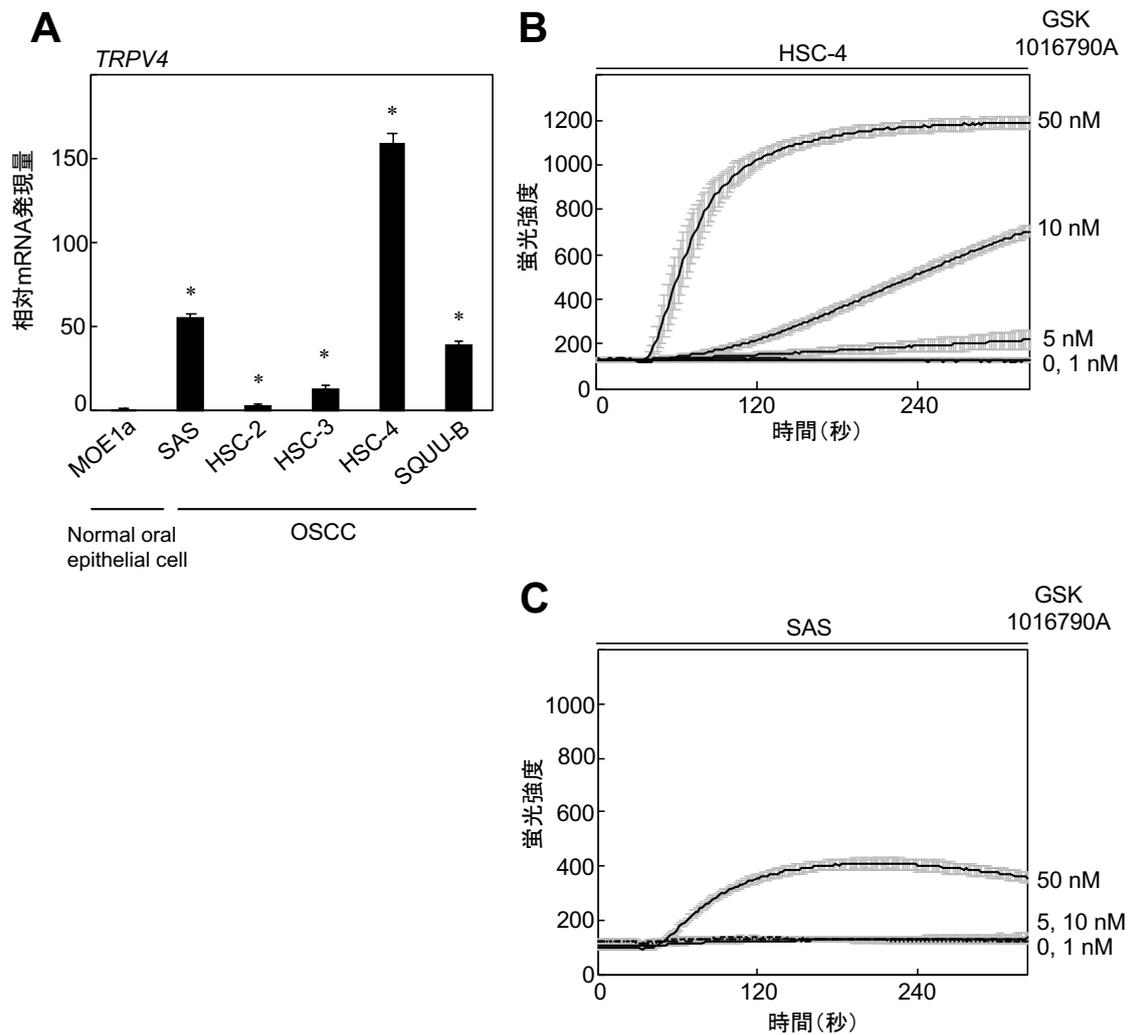


図1 OSCC 細胞株における *TRPV4* の発現解析

(A) OSCC 細胞株 (SAS、HSC-2、HSC-3、HSC-4、SQUU-B) およびヒト正常口腔上皮細胞株 (MOE1a) における *TRPV4* 発現量を quantitative RT-PCR を用いて測定した。内在性遺伝子の基準として *GAPDH* を用い、MOE1a の *TRPV4* mRNA 発現量を基準としてそれぞれの相対的な *TRPV4* 発現量を各細胞間で比較した。 (\* $p < 0.01$ )

(B, C)  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブである Fluo-4 AM を培養液に添加して HSC-4 (B) と SAS (C) を培養し、0、1、5、10、50 nM の GSK1016790A を作用させた。蛍光プレートリーダー (Flex Station<sup>®</sup> 3) を用いて細胞内流入した  $\text{Ca}^{2+}$  による蛍光強度を測定した。

### TRPV4 はアゴニスト依存的に Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能している

HSC-4 における TRPV4 の機能を明らかにするために、siRNA を用いて TRPV4 のノックダウン (knock down: KD) を行った (図 2A)。TRPV4 を KD すると、HSC-4 において TRPV4 選択的アゴニストである GSK1016790A 依存性の Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が減少した (図 2B)。また、TRPV4 選択的アンタゴニストである GSK2193874 存在下における Ca<sup>2+</sup>細胞内流入について検討したところ、siRNA による KD と同様に、TRPV4 選択的アゴニストである GSK1016790A 依存性の Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が減少した (図 2C)。また、SAS においても同様に TRPV4 を KD すると、TRPV4 選択的アゴニストである GSK1016790A 依存性の Ca<sup>2+</sup>細胞内流入は減少した (図 3A, B)。これらの結果から、OSCC 細胞株において TRPV4 はアゴニスト存在下で Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能していることが示唆された。

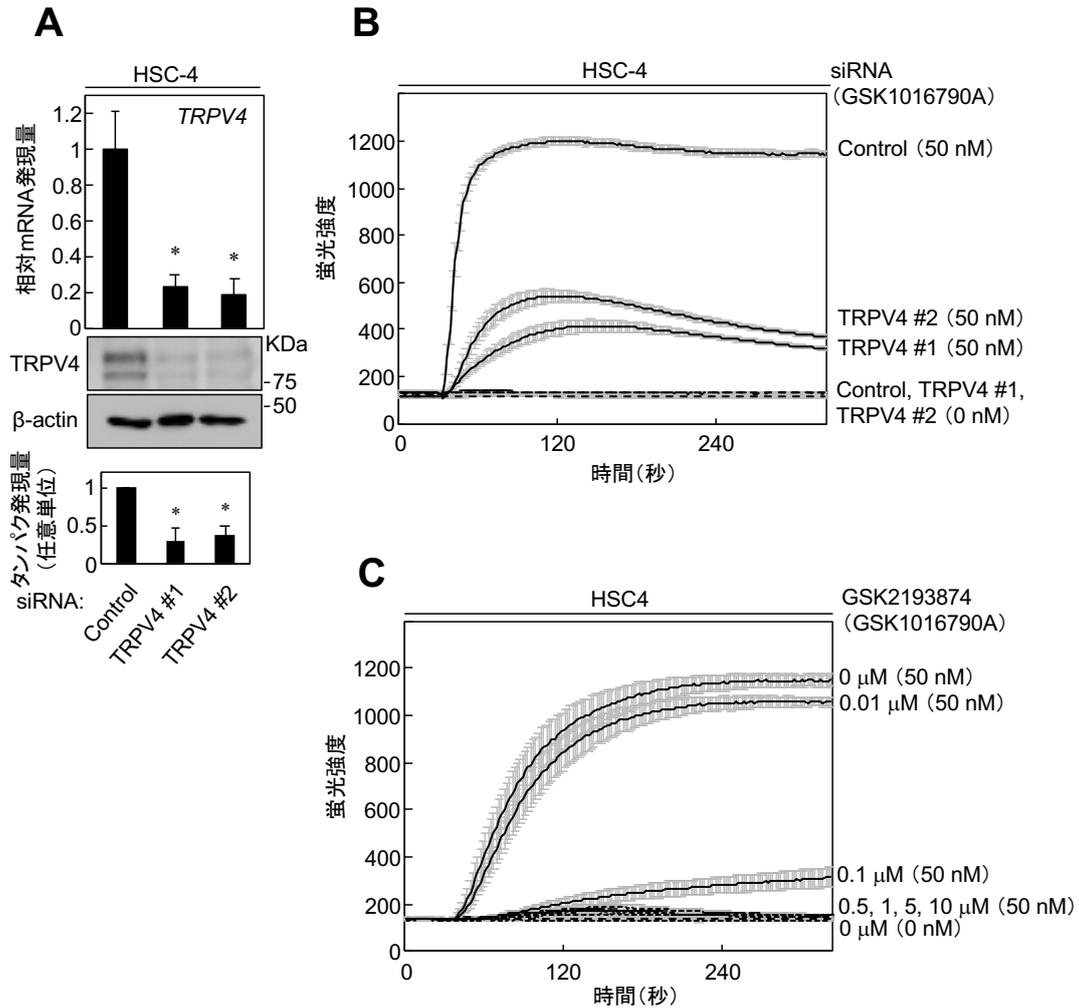


図2 HSC-4におけるTRPV4 siRNAの導入

(A) HSC-4にTRPV4 siRNAとコントロールをそれぞれ導入した。TRPV4はquantitative RT-PCRを用いて測定し、内在性遺伝子の基準としてGAPDHを用いた。コントロール siRNAの mRNA 発現量を基準として相対的なTRPV4発現量を比較した。タンパク解析には、抗TRPV4抗体と抗β-actin抗体を用いた。ImageJを用いてバンドの強度を測定し、定量化した。(\* $p < 0.01$ )

(B) TRPV4 siRNAを導入したHSC-4をCa<sup>2+</sup>蛍光プローブであるFluo-4 AMを添加した培地にて培養した。50 nMのGSK1016790Aを作用させた。蛍光プレートリーダー(Flex Station<sup>®</sup>3)を用いて細胞内流入したCa<sup>2+</sup>による蛍光強度を測定した。

(C) HSC-4をCa<sup>2+</sup>蛍光プローブであるFluo-4 AMを添加した培地にて培養した。0、0.01、0.1、0.5、1、5、10 μMのGSK2193874で処理した細胞に、50 nMのGSK1016790Aを作用させた。蛍光プレートリーダー(Flex Station<sup>®</sup>3)を用いて細胞内流入したCa<sup>2+</sup>による蛍光強度を測定した。

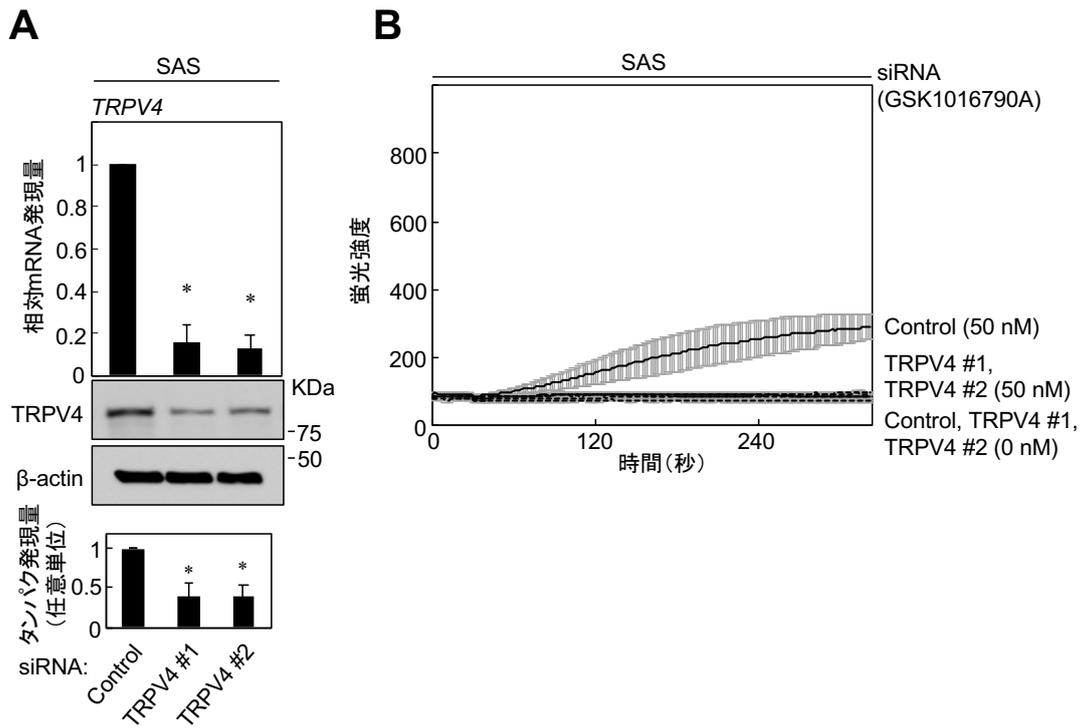


図3 SASにおけるTRPV4 siRNAの導入

(A) SASにTRPV4 siRNAとコントロールをそれぞれ導入した。TRPV4はquantitative RT-PCRを用いて測定し、内在性遺伝子の基準としてGAPDHを用いた。コントロールsiRNAのmRNA発現量を基準として相対的なTRPV4発現量を比較した。タンパク解析には、抗TRPV4抗体と抗β-actin抗体を用いた。ImageJを用いてバンドの強度を測定し、定量化した。(\* $p < 0.01$ )

(B) TRPV4 siRNAを導入したSASをCa<sup>2+</sup>蛍光プローブであるFluo-4 AMを添加した培地にて培養した。50 nMのGSK1016790Aを作用させた。蛍光プレートリーダー(Flex Station<sup>®</sup> 3)を用いて細胞内流入したCa<sup>2+</sup>による蛍光強度を測定した。

### TRPV4 はアゴニスト非存在下にて Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能している

次に、アゴニスト非存在下における TRPV4 の機能について検討した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>インジケータである OGB-1 を用いて、アゴニスト非存在下における Ca<sup>2+</sup>細胞内流入について検討した。HSC-4 と SAS に siRNA を用いて TRPV4 を KD すると、Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が減少した (図 4A, B)。以上より、TRPV4 はアゴニスト非存在下において Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能していると考えられた。また、4-1. の結果から、内因性 TRPV4 の発現が OSCC 細胞株において Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能していると考えられた。

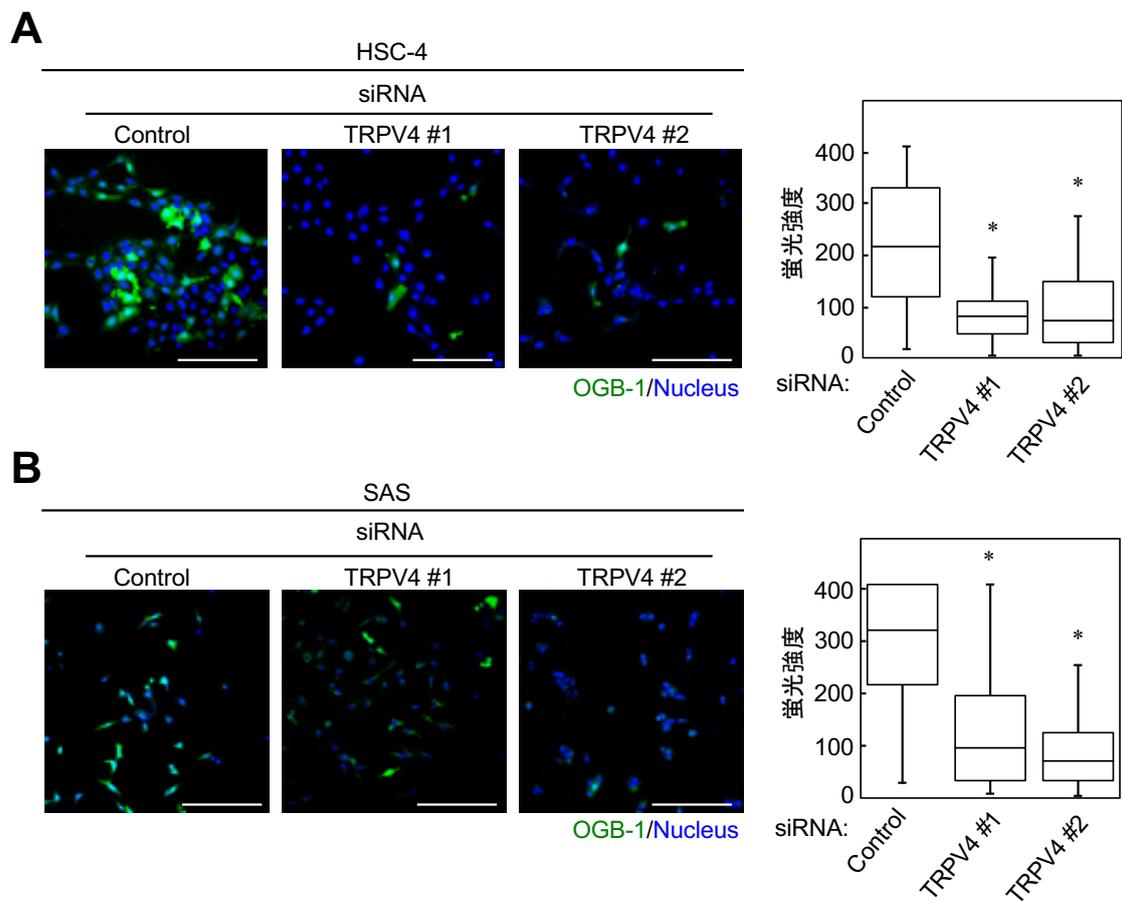


図4 HSC-4 と SAS における内因性 TRPV4 の機能解析

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA とコントロールを導入し、48 時間培養した。培養終了 1 時間前に 8  $\mu$ M OGB-1 を添加した。培養終了後 Hoechst 33342 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、蛍光強度を測定した。

スケールバー: 50  $\mu$ m (\* $p$  < 0.01)

#### 4-2. TRPV4 の発現は OSCC 細胞増殖を正に制御する

TRPV4 は胃癌 [17, 18] や肝細胞癌 [19] において腫瘍形成に関与することが報告されていることから、OSCC 細胞株における細胞増殖に与える影響について検討した。siRNA を用いて TRPV4 を KD すると、HSC-4 と SAS にて、日数依存的に細胞増殖が抑制され、Ki-67 陽性細胞の割合が減少した (図 5A-C)。さらに TRPV4 選択的アンタゴニストである GSK2193874 を HSC-4 に作用させると、濃度依存的に細胞増殖が抑制された (図 5D)。以上の結果から、TRPV4 の発現は OSCC 細胞株の細胞増殖に必要であると考えられた。

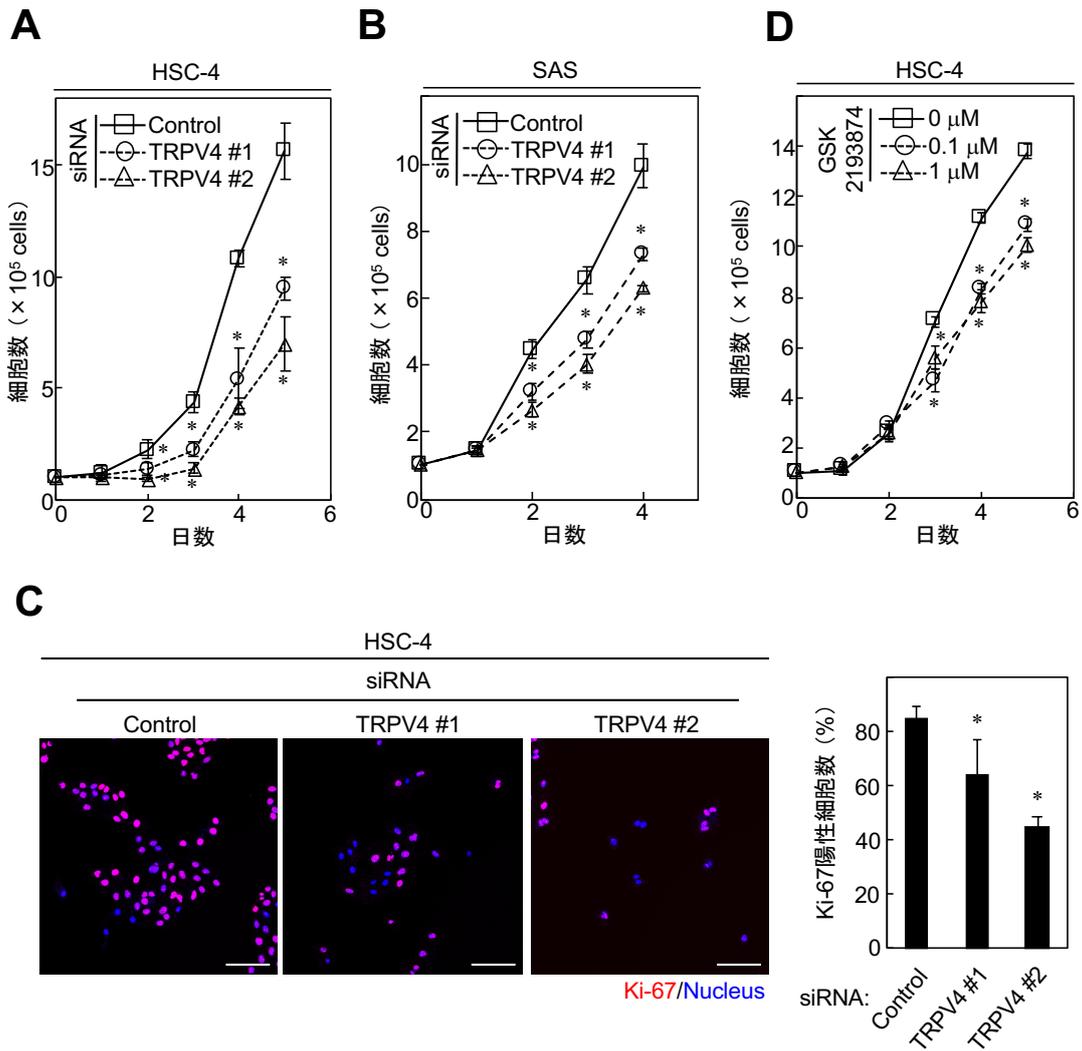


図5 OSCC細胞株におけるTRPV4機能抑制による細胞増殖能の検討

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA を導入し 5% FBS 含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。

(C) HSC-4 に TRPV4 siRNA を導入し 48 時間培養した。その後、抗 Ki-67 抗体と Hoechst 33342 で染色し、それぞれの細胞数を計測した。全細胞数に対する Ki-67 陽性細胞数の割合をグラフに示す。

(D) HSC-4 を 0、0.1、1 μM の GSK2193874 を添加した 5% FBS 含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。

スケールバー: 100 μm (\**p* < 0.01)

## TRPV4 の発現は OSCC 細胞遊走を正に制御する

次に細胞遊走能について検討を行なった。siRNA を用いて TRPV4 を KD すると、HSC-4 と SAS の細胞遊走能は低下した (図 6A, B)。この結果から、TRPV4 の発現が OSCC 細胞株の細胞遊走を正に制御すると考えられた。

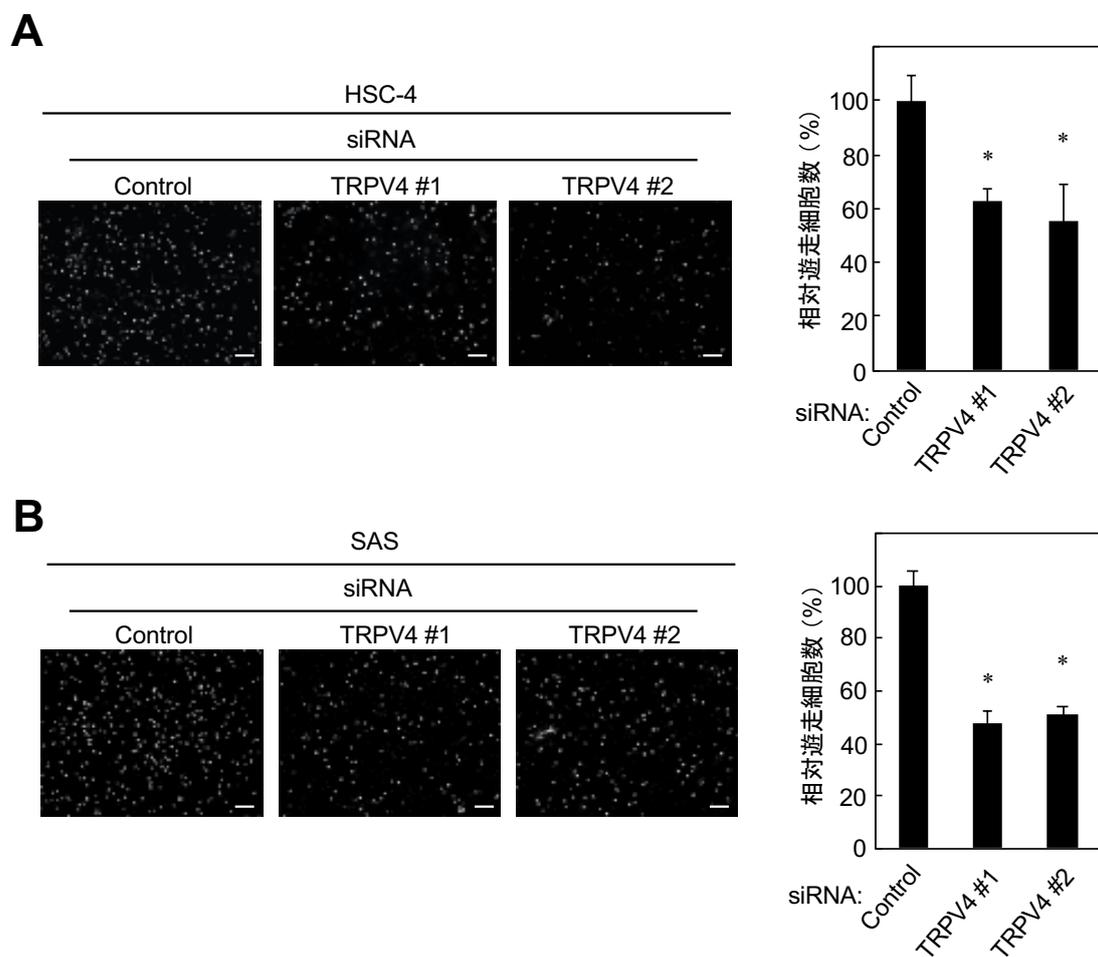


図 6 OSCC 細胞株における TRPV4 機能抑制による細胞遊走能の検討

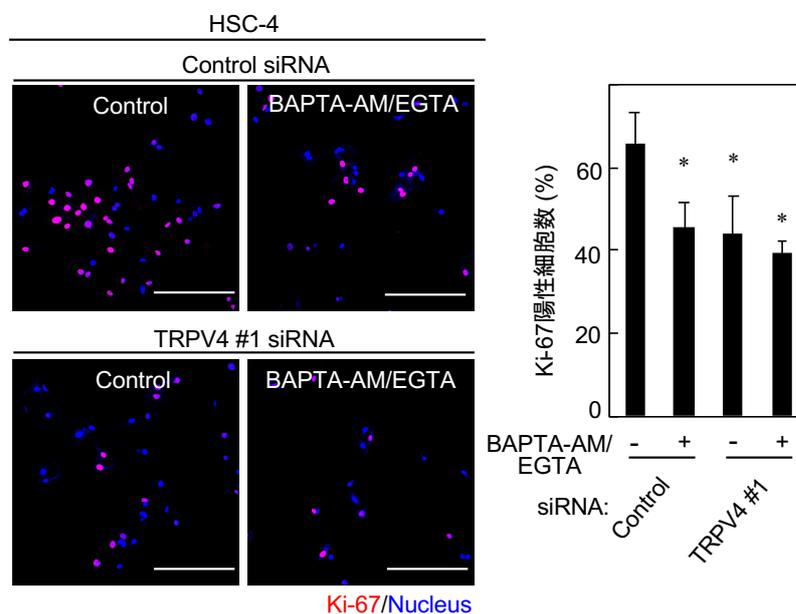
(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA とコントロールを導入し、細胞遊走能を検討した。コントロールと比較した相対遊走細胞数比をグラフに示す。

スケールバー: 200  $\mu$ m (\* $p < 0.01$ )

### 4-3. TRPV4 を介した Ca<sup>2+</sup>細胞内流入は OSCC 細胞増殖を正に制御する

4-1.より、OSCC 細胞株において TRPV4 が Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能していることが示唆され、また 4-2.より、TRPV4 の発現が OSCC 細胞株において細胞増殖、細胞遊走を制御していることが明らかとなった。そこで、TRPV4 を介した Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が細胞増殖と細胞遊走に関与しているかを明らかにするために、細胞内外の Ca<sup>2+</sup>活性をキレート剤にて消失させることにより、細胞増殖に与える影響について検討を行った。HSC-4 と SAS に siRNA を用いて TRPV4 を KD した場合、細胞内カルシウムキレート剤 (BAPTA-AM) と細胞外カルシウムキレート剤 (EGTA) を用いて細胞内外の Ca<sup>2+</sup>の活性を消失させた場合、および siRNA を用いた TRPV4 の KD と BAPTA-AM/EGTA 処理の両方を行なった場合のいずれも、Ki-67 陽性細胞の割合が減少した (図 7A, B)。さらに、siRNA を用いた TRPV4 の KD と BAPTA-AM/EGTA 処理の両方を行なった場合の Ki-67 陽性細胞の割合は、siRNA を用いた TRPV4 の KD のみ、または BAPTA-AM/EGTA 処理のみを行なった場合の割合と同等であった (図 7A, B)。以上の結果から、TRPV4 を介した Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が OSCC 細胞株の細胞増殖に関与していると考えられた。

**A**



**B**

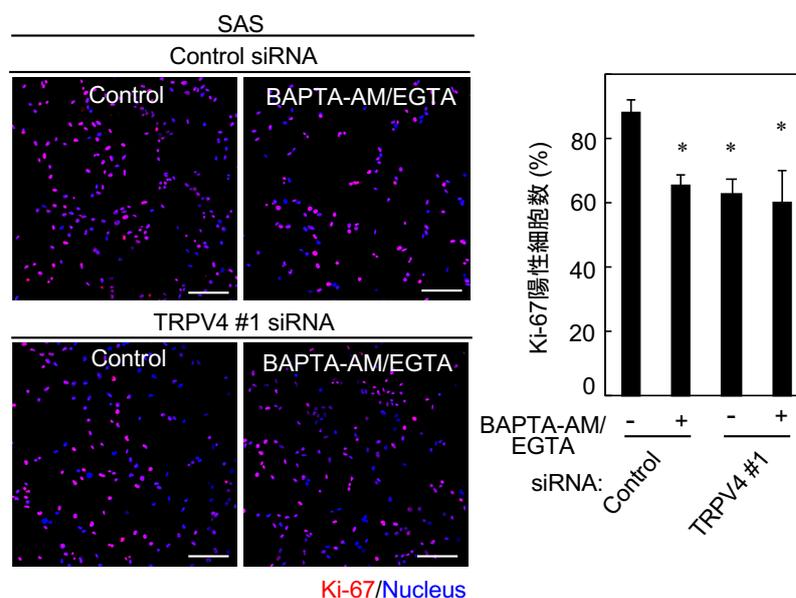


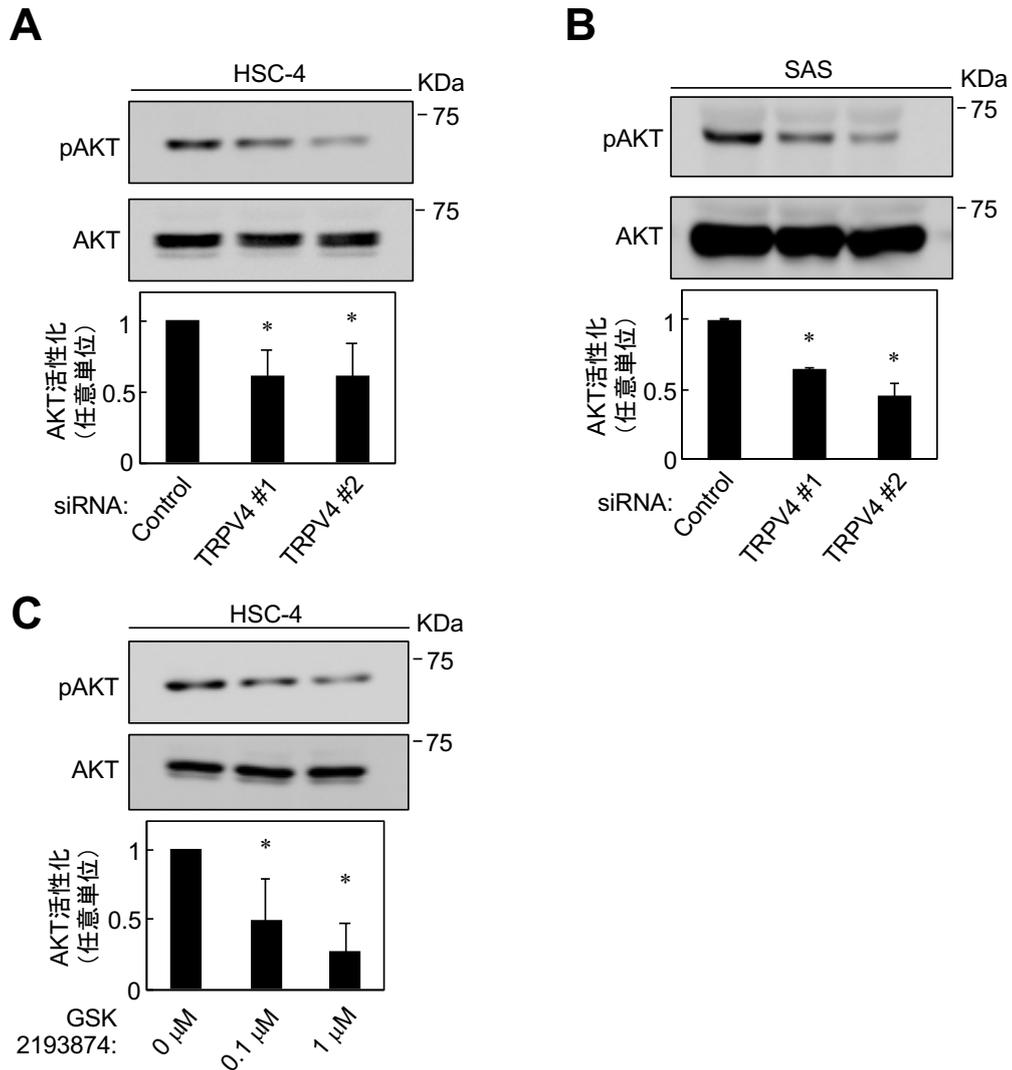
図7 OSCC 細胞株における  $\text{Ca}^{2+}$  活性消失による細胞増殖能の検討

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA とコントロールを導入し 48 時間培養した。培養開始 40 時間後から 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM と 1 mM EGTA による処理を 8 時間行った。その後、抗 Ki-67 抗体と Hoechst 33342 で染色し、それぞれの細胞数を計測した。全細胞数における Ki-67 陽性細胞数の割合をグラフに示す。

スケールバー: 50  $\mu\text{m}$  (\* $p < 0.01$ )

#### 4-4. TRPV4 の発現は AKT を活性化する

4-2.と 4-3.の結果から、OSCC 細胞株における TRPV4 を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入が細胞増殖と細胞遊走に関与することが明らかとなったため、その下流シグナルについて検討を行なった。以前の報告 [32-35] より、TRPV4 の下流で AKT が活性化することから、本研究でも同様に検討を行なった。HSC-4 と SAS に siRNA を用いて TRPV4 を KD すると、AKT のリン酸化が抑制された (図 8A, B)。また、HSC-4 に TRPV4 選択的アンタゴニストである GSK2193874 を作用させると、濃度依存的に AKT のリン酸化が抑制された (図 8C)。これらの結果から、OSCC 細胞株において TRPV4 が AKT の活性化を制御していることが明らかになった。



**図8** OSCC 細胞株における TRPV4 機能抑制による AKT 活性化の検討

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA とコントロールを導入し 48 時間培養した。細胞溶解液を抗 AKT 抗体と抗 pAKT 抗体で標識した。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。

(C) HSC-4 に 0、0.1、1  $\mu$ M の GSK2193874 を作用させ、48 時間培養した。細胞溶解液を抗 AKT 抗体と抗 pAKT 抗体で標識した。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。

(\* $p < 0.01$ )

#### 4-5. TRPV4 の発現は CaMKII の活性化を介して OSCC 細胞増殖を促進する

4-4.の結果から、TRPV4 が AKT の活性化に関与することが明らかとなったため、TRPV4 の下流において  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入を介して AKT を活性化する分子基盤について検討した。 $\text{Ca}^{2+}$ は代表的な細胞内セカンドメッセンジャーであり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ は、カルモジュリン (calmodulin: CaM) と複合体を形成し、 $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (calmodulin kinase: CaMK) を活性化する [36] (図 9)。本研究では、CaMKII に着目し検討を行なった。HSC-4 と SAS に siRNA を用いて TRPV4 を KD すると、CaMKII の活性化が抑制された (図 10A, B)。さらに、異なる 2つの CaMKII 阻害剤 (CaMKII inhibitor XII、Arcyliaflavin A) を作用させると、細胞増殖が抑制された (図 10C)。これらの結果から、TRPV4 が CaMKII の活性化を介して、OSCC 細胞株の細胞増殖を制御すると考えられた。

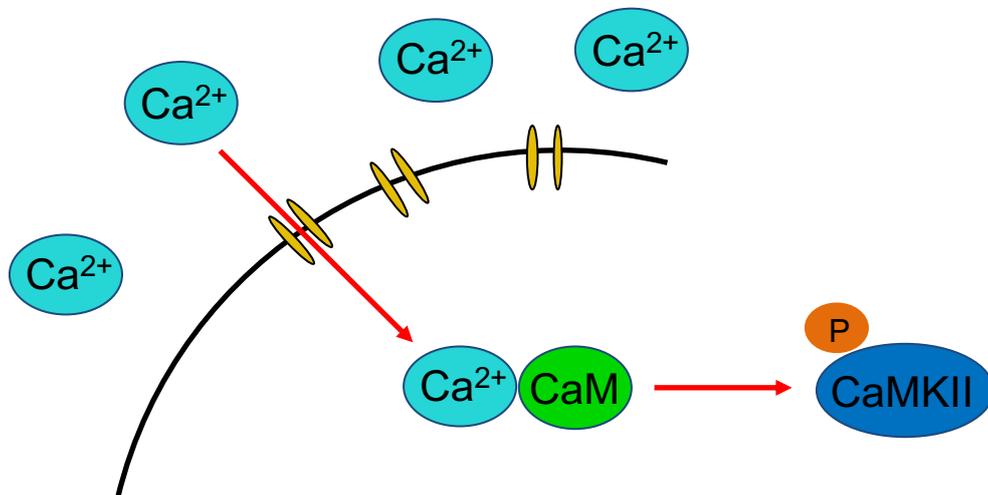


図 9  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体形成と CaMKII 活性化の模式図

細胞内流入した  $\text{Ca}^{2+}$ が CaM と複合体を形成し、CaMKII をリン酸化することで、CaMKII を活性化する。

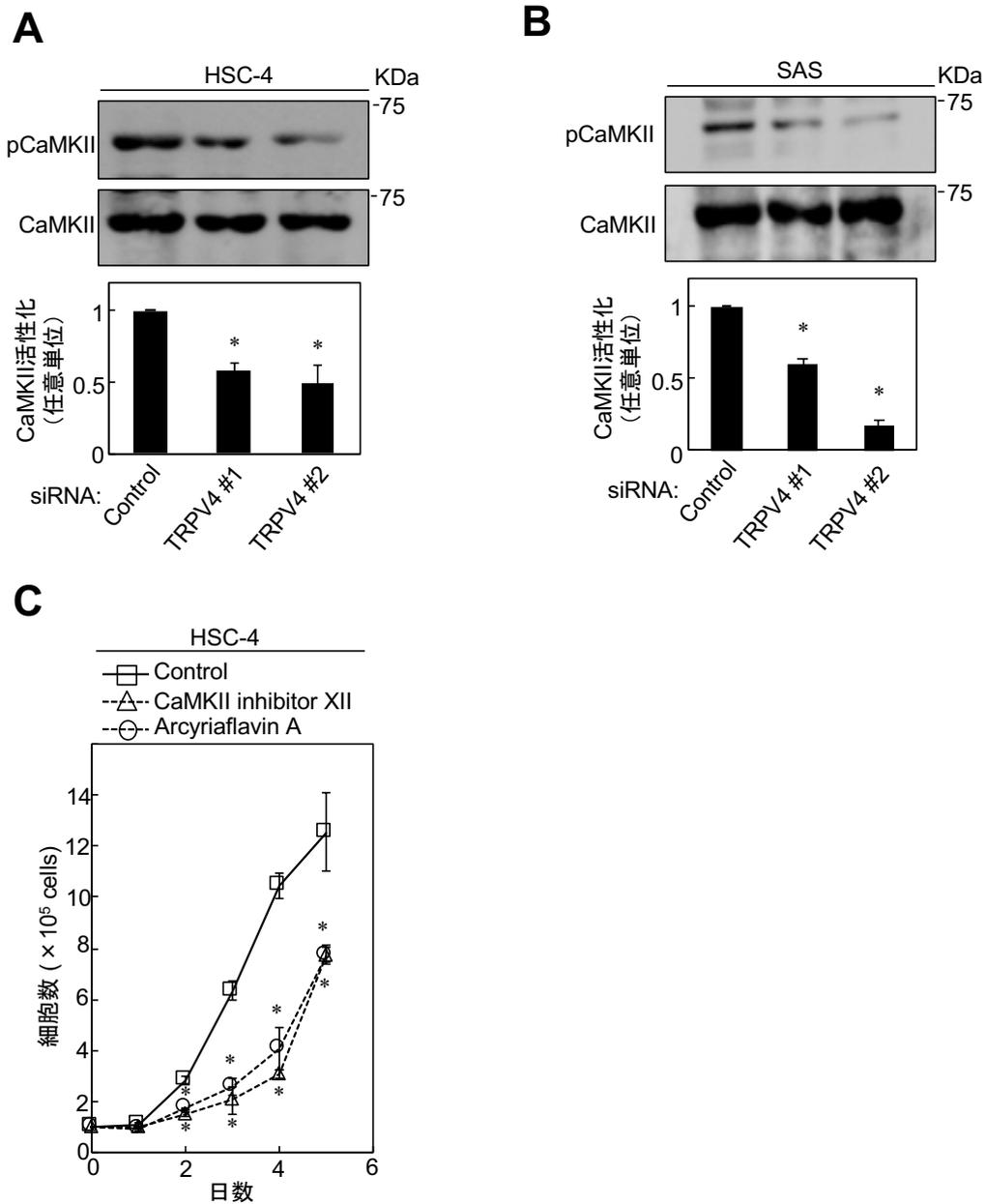


図 10 OSCC 細胞株における TRPV4 機能抑制による CaMKII の活性化と CaMKII 阻害による細胞増殖能の検討

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に TRPV4 siRNA とコントロールを導入し 48 時間培養した。細胞溶解液を抗 CaMKII 抗体と抗 pCaMKII 抗体で標識した。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。

(C) HSC-4 を 10  $\mu$ M CaMKII inhibitor XII または 10  $\mu$ M Arcyriaflavin A を添加した 5% FBS 含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。

(\* $p < 0.01$ )

#### 4-6. TRPV4 の下流で CaMKII/AKT が活性化し OSCC 細胞増殖を促進する

Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体は、CaMK の活性化に加え、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase: PI3K) /AKT を活性化する [37] という報告がある。4-5.の結果より、Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体は CaMKII の活性化に参与することから、CaMKII が AKT の活性化に与える影響について検討を行った。HSC-4 と SAS に、異なる 2 つの CaMKII 阻害剤 (CaMKII inhibitor XII、Arcyliaflavin A) を作用させると、いずれも AKT のリン酸化が抑制された (図 11A, B)。さらに、AKT 阻害剤 (AKT inhibitor VIII) を作用させると、細胞増殖が抑制された (図 11C, D)。これらの結果から、CaMKII の活性化は AKT の活性化に参与し、細胞増殖を制御すると考えられた。以上の結果ならびに 4-4.と 4-5.の結果から、TRPV4 の下流では、CaMKII/AKT の活性化を介して、OSCC 細胞株の細胞増殖を促進すると考えられた。

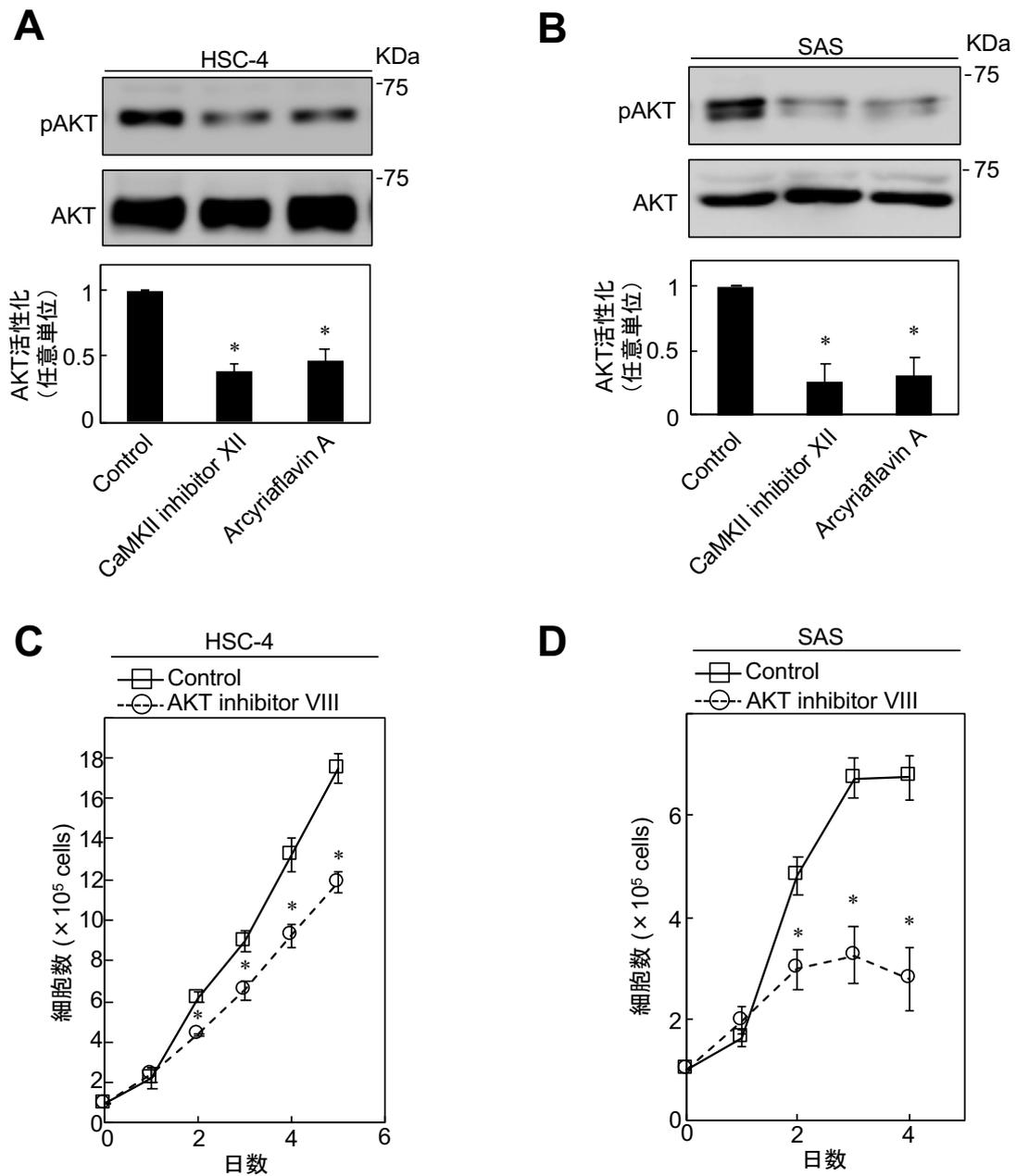


図 11 OSCC 細胞株における CaMKII 機能抑制による AKT 活性化と AKT 機能抑制による細胞増殖能の検討

(A, B) HSC-4 (A) と SAS (B) に 10  $\mu$ M CaMKII inhibitor XII または 10  $\mu$ M Arcyriaflavin A を添加し、24 時間培養した。細胞溶解液を抗 AKT 抗体と抗 pAKT 抗体で標識した。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。

(C, D) HSC-4 (C) と SAS (D) を 10  $\mu$ M AKT inhibitor VIII を添加した 5% FBS 含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。(\* $p < 0.01$ )

#### 4-7. 内因性 TRPV4 は CaMKII/AKT を活性化し OSCC 細胞増殖を促進する

TRPV4 の機能をさらに解明するために、HSC-4 を用いた機能回復実験を行った。まず、レンチウイルスを用いてコントロール (mock) または TRPV4 を外因性に過剰発現する HSC-4 を作製し、3'末端-非翻訳領域(3'-untranslated region: 3'-UTR) を標的として設計した (“材料と方法”参照) TRPV4 siRNA #1 を用いて KD した。WB にて siRNA の TRPV4 タンパク質発現抑制が回復したことを確認した (図 12A)。また、3'-UTR に対応するプライマーを用いた quantitative RT-PCR によって TRPV4 siRNA #1 の効果を評価し、内因性 *TRPV4* mRNA 発現レベルが低下したことを確認した (図 12A)。さらに、HSC-4 に TRPV4 を外因性に過剰発現させると、コントロール群では GSK1016790A 刺激による Ca<sup>2+</sup>細胞内流入が増加した (図 12B)。

TRPV4 を外因性に過剰発現させた HSC-4 は、コントロール細胞株 (mock) と同程度の増殖能と遊走能を認めた (図 13A-C)。また、HSC-4 に TRPV4 を外因性に過剰発現させると、TRPV4 siRNA #1 を用いた KD による CaMKII と AKT 活性化の低下が回復した (図 14A, B)。これらにより、TRPV4 siRNA #1 を用いた KD によって得られた Ca<sup>2+</sup>流入、増殖能、遊走能、CaMKII 活性化および AKT 活性化の低下の回復が確認された (図 12-14)。しかし、内因性 CaMKII と AKT の活性化は促進されなかった (図 14A, B) ことから、HSC-4 において、内因性 TRPV4 の発現量が、CaMKII/AKT の活性化を介した細胞増殖と遊走を促進するのに十分であると考えられた。また、これらの結果から、siRNA を用いて得られた実験結果が、siRNA のオフターゲット効果ではないことを確認した。

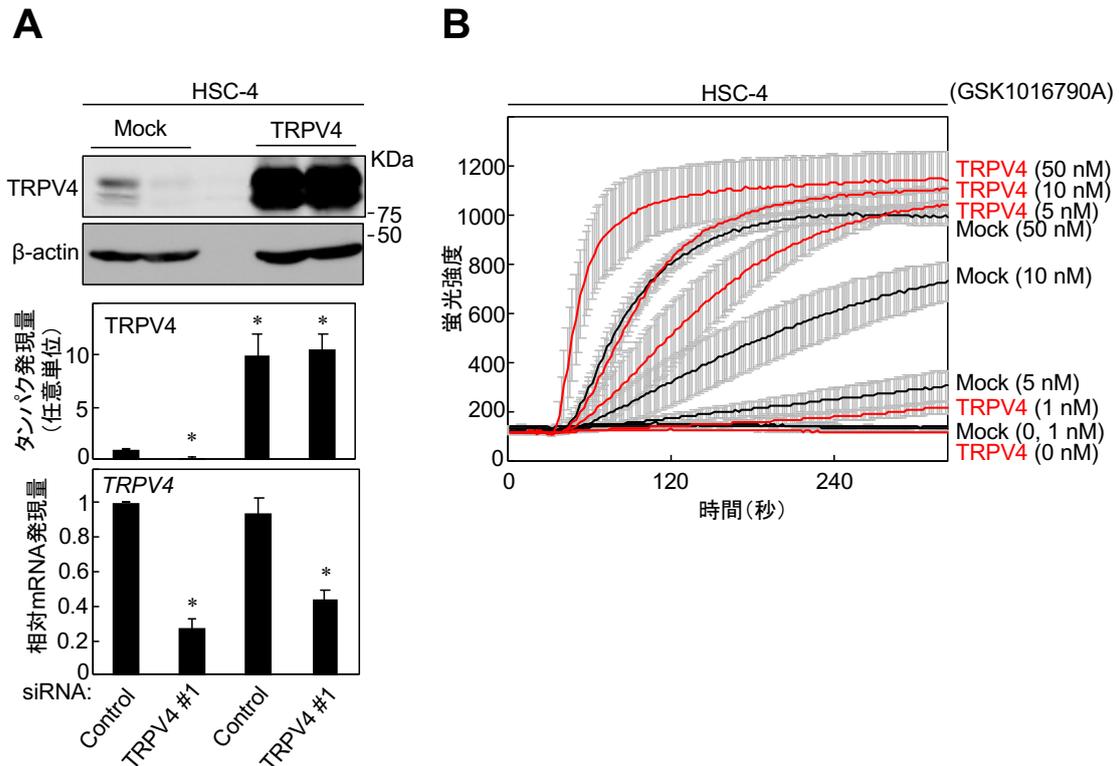


図 12 HSC-4 における TRPV4 発現による  $\text{Ca}^{2+}$  細胞内流入の検討

(A) HSC-4 の *TRPV4* 過剰発現株 (TRPV4) を作製し、コントロール細胞株 (mock) と比較した。これら細胞株に TRPV4 siRNA #1 とコントロール siRNA をそれぞれ導入した。タンパク解析には、抗 TRPV4 抗体と抗  $\beta$ -actin 抗体を用いた。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。*TRPV4* は quantitative RT-PCR を用いて測定し、内源性遺伝子の基準として *GAPDH* を用いた。コントロール siRNA の mRNA 発現量を基準として相対的な *TRPV4* 発現量を比較した。(\* $p < 0.01$ )

(B) TRPV4 siRNA #1 を導入した HSC-4 の *TRPV4* 過剰発現株 (TRPV4) と、コントロール細胞株 (mock) を、 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブである Fluo-4 AM を添加した培地にて培養した。0、1、5、10、50 nM の GSK1016790A を作用させた。蛍光プレートリーダー (Flex Station<sup>®</sup> 3) を用いて細胞内流入した  $\text{Ca}^{2+}$  による蛍光強度を測定した。

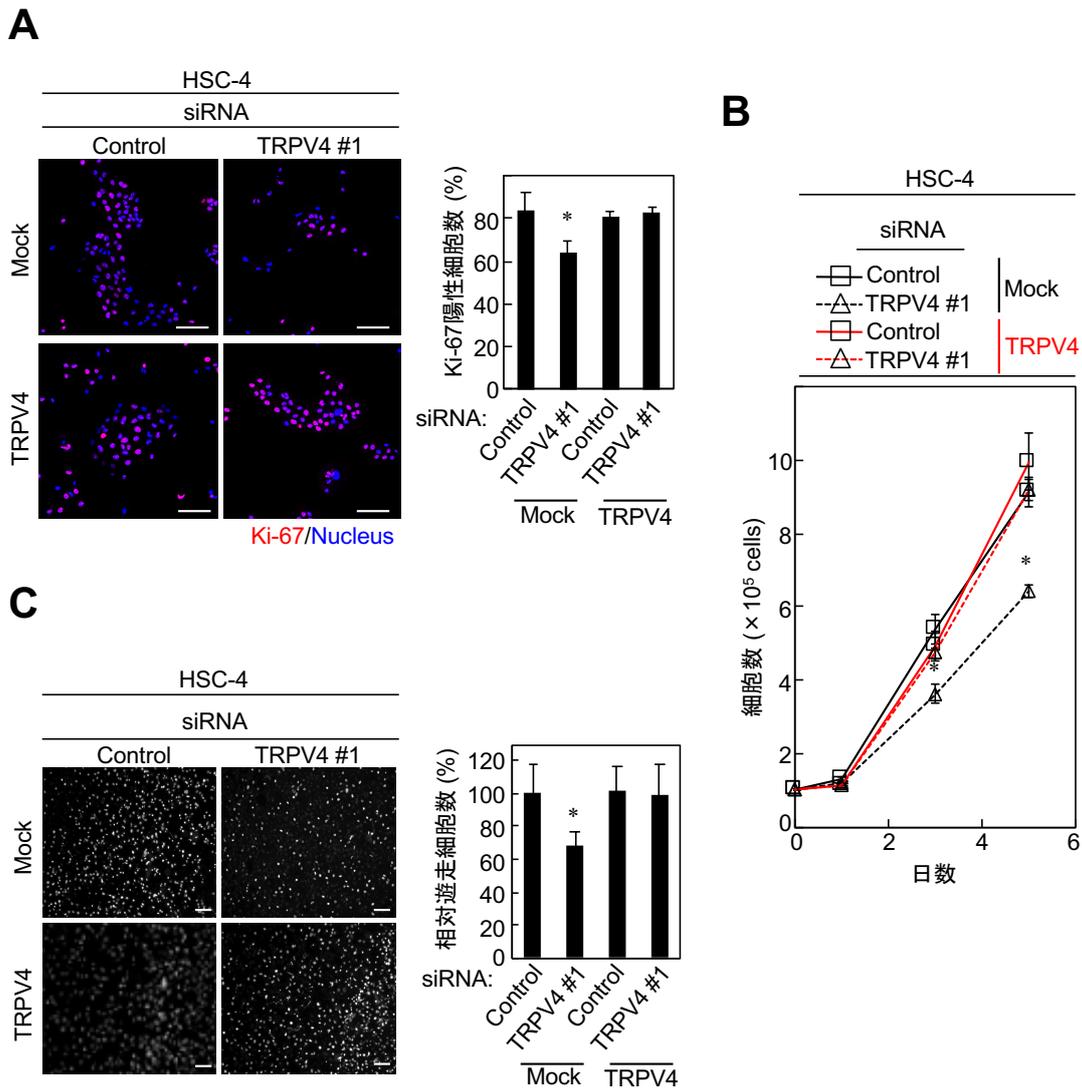


図13 HSC-4におけるTRPV4発現による細胞増殖能と遊走能の検討

(A) HSC-4のTRPV4過剰発現株(TRPV4)とコントロール細胞株(mock)にTRPV4 siRNA #1とコントロール siRNAを導入した。抗Ki-67抗体とHoechst 33342で染色し、それぞれの細胞数を計測した。全細胞数に対するKi-67陽性細胞数の割合をグラフに示す。

スケールバー: 100  $\mu$ m

(B) HSC-4のTRPV4過剰発現株(TRPV4)とコントロール細胞株(mock)にTRPV4 siRNA #1とコントロール siRNAを導入し、5% FBS含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。

(C) HSC-4のTRPV4過剰発現株(TRPV4)とコントロール細胞株(mock)にTRPV4 siRNA #1とコントロール siRNAを導入し、細胞遊走能を検討した。コントロールと比較した相対遊走細胞数比をグラフに示す。スケールバー: 200  $\mu$ m (\* $p < 0.01$ )

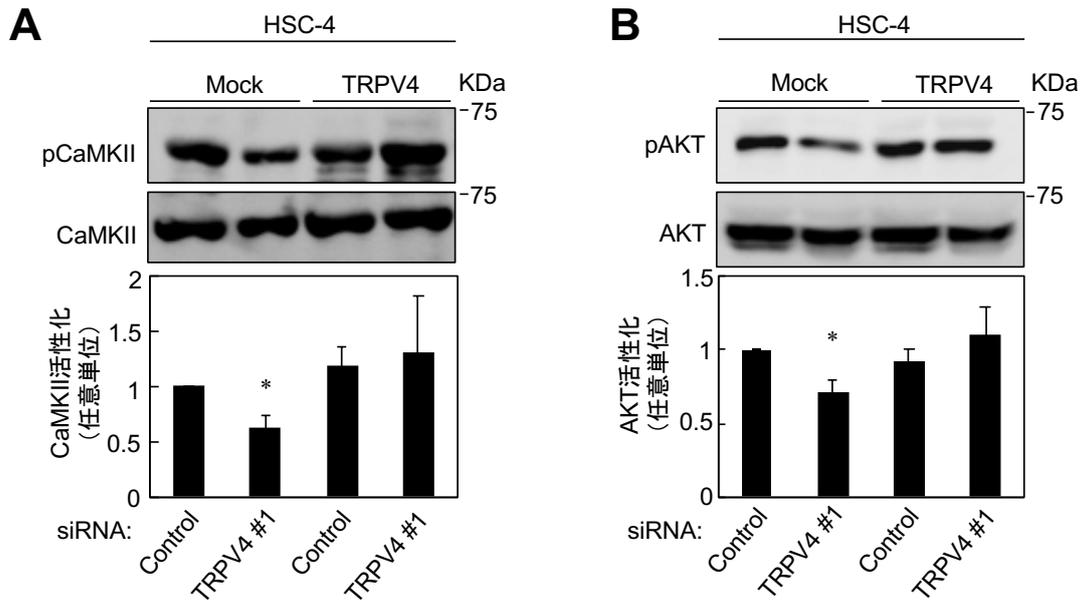


図 14 HSC-4 における TRPV4 発現による CaMKII と AKT 活性化の検討

(A, B) HSC-4 の *TRPV4* 過剰発現株 (TRPV4) とコントロール細胞株 (mock) に TRPV4 siRNA #1 とコントロール siRNA を導入した。細胞溶解液を抗 CaMKII 抗体と抗 pCaMKII 抗体 (A)、抗 AKT 抗体と抗 pAKT 抗体 (B) で標識した。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。(\* $p < 0.01$ )

#### 4-8. TRPV4 は細胞外環境を感知し OSCC 細胞増殖を制御する

siRNA を用いた上記の各種 *in vitro* 実験結果から、OSCC 細胞株において、TRPV4 を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入が、CaMKII の活性化を介して AKT を活性化することで細胞増殖、細胞遊走を制御していることが明らかとなった。そこで、各種培養実験と *in vivo* 実験にてさらに検討を行なった。まず、内因性 TRPV4 の発現レベルを恒常的に低下させるために TRPV4 shRNA #1 を作製した。shRNA の標的配列は TRPV4 siRNA #1 の標的配列と同一になるよう設計した（“材料と方法”参照）。作製した shRNA を、レンチウイルスを用いて HSC-4 に感染させ、TRPV4 shRNA #1 を恒常的に発現する HSC-4 を作製した。この細胞株は、mRNA レベルとタンパクレベルで TRPV4 の発現が減少していた（図 15A）。siRNA を用いた実験結果と同様に、GSK1016790A 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入が低下した（図 15B）。

次に、TRPV4 は、機械刺激などの細胞外刺激に反応することで腫瘍形成に関与することが報告されているため [13-16]、異なる培養環境が HSC-4 の細胞増殖に与える影響について検討した。TRPV4 shRNA #1 を導入した HSC-4 を用いて、低接着性プラスチック皿を用いた低接着培養、2D プラスティック皿を用いた 2D 培養および 3D マトリゲルを用いた 3D 培養を行なった（図 16）。低接着培養では、コントロール群と TRPV4 shRNA #1 群において腫瘍細胞塊の大きさに有意差は認められなかった（図 17A）。また、極度に硬い細胞外環境が想定される 2D 培養も、コントロール群と TRPV4 shRNA #1 群において、増殖能に有意差は認められなかった（図 17B）。一方、生体内の細胞外環境に近いと考えられるマトリゲルを用いた 3D 培養では、TRPV4 shRNA #1 群において、腫瘍細胞塊の大きさと増殖能がコントロール群の約半分程度に減少した（図 18）。これらの結果から、TRPV4 の発現が細胞外環境を感知し応答することで、

OSCC 細胞増殖を調節することが示唆された。また、2D 培養において、TRPV4 siRNA #1 と shRNA #1 の増殖実験の結果が異なること (図 5A, 17B) は、標的遺伝子の KD 効率の差に依存している可能性が考えられた (図 2A, 15A)。

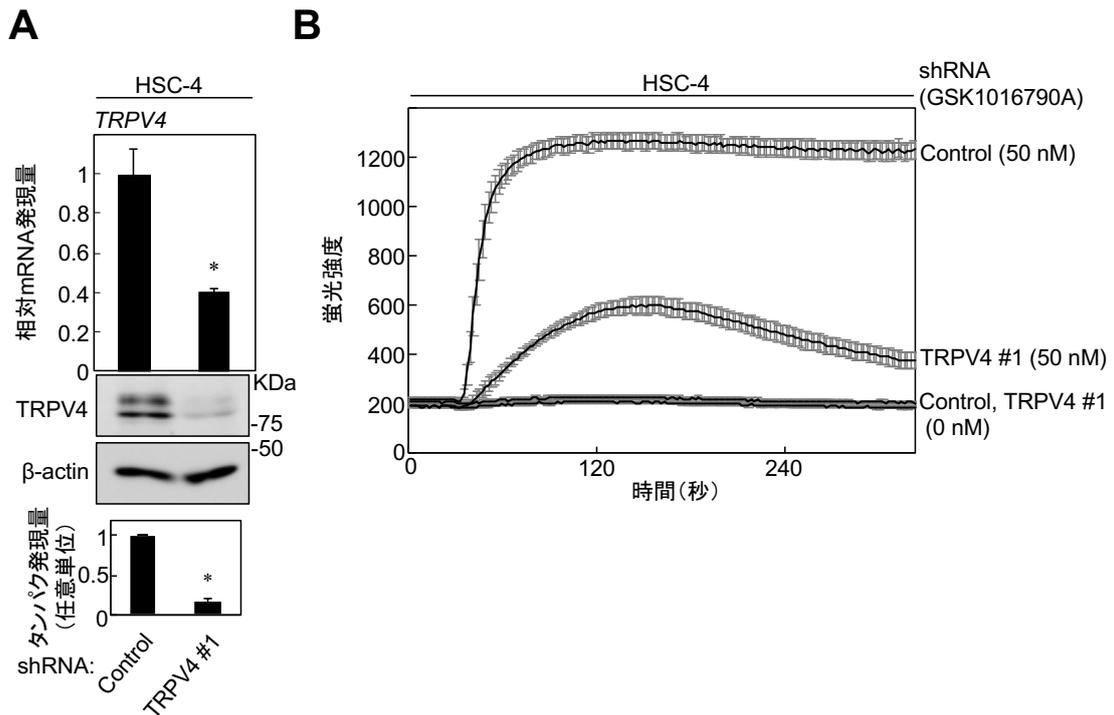


図 15 HSC-4 における TRPV4 shRNA の導入

(A) HSC-4 に TRPV4 shRNA #1 とコントロールをそれぞれ導入した。TRPV4 は quantitative RT-PCR を用いて測定し、内在性遺伝子の基準として *GAPDH* を用いた。コントロール shRNA の mRNA 発現量を基準として相対的な TRPV4 発現量を比較した。タンパク解析には抗 TRPV4 抗体と抗  $\beta$ -actin 抗体を用いた。ImageJ を用いてバンドの強度を測定し、定量化した。(\* $p < 0.01$ )

(B) TRPV4 shRNA #1 を導入した HSC-4 を  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブである Fluo-4 AM を添加した培地にて培養した。50 nM の GSK1016790A を作用させた。蛍光プレートリーダー (Flex Station<sup>®</sup> 3) を用いて細胞内流入した  $\text{Ca}^{2+}$  による蛍光強度を測定した。

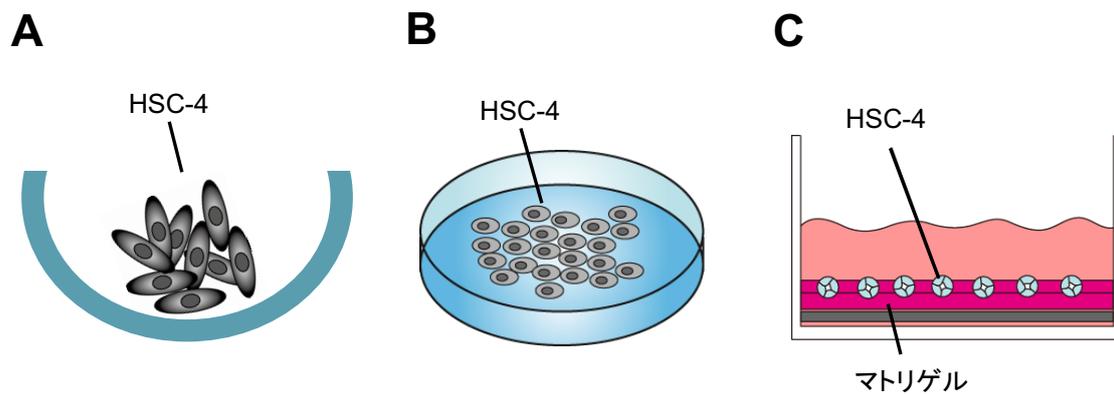


図 16 各種培養環境の模式図

- (A) 低接着性プラスチック皿を用いた低接着培養。
- (B) 2D プラスティック皿を用いた 2D 培養。
- (C) 3D マトリゲルを用いた 3D 培養。

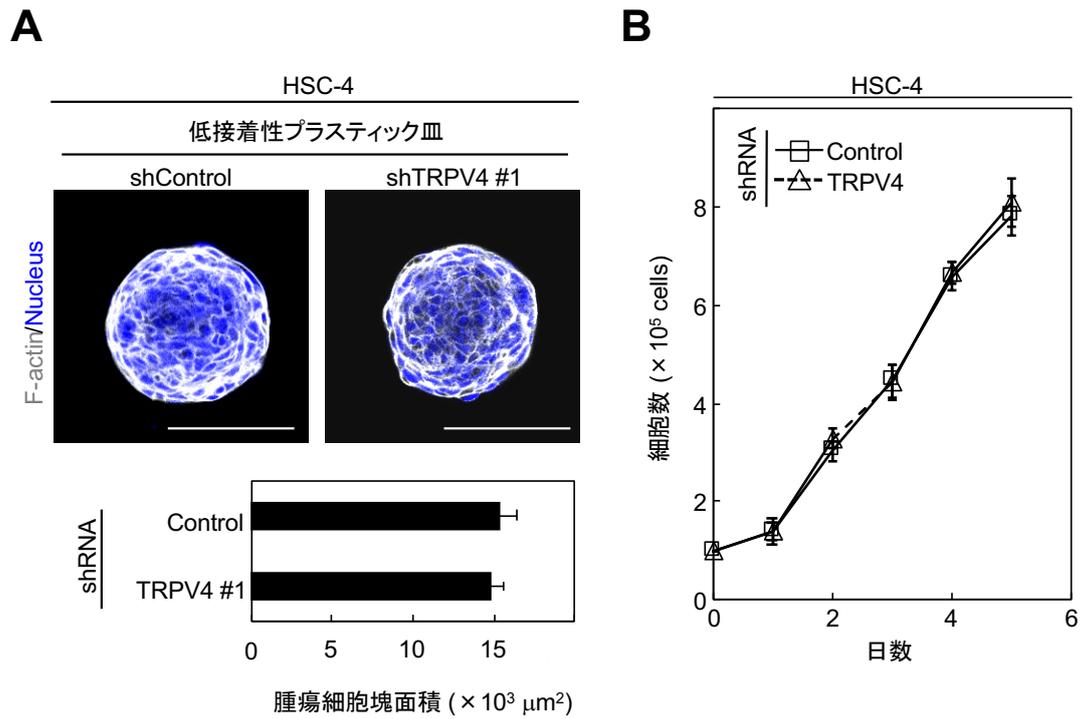
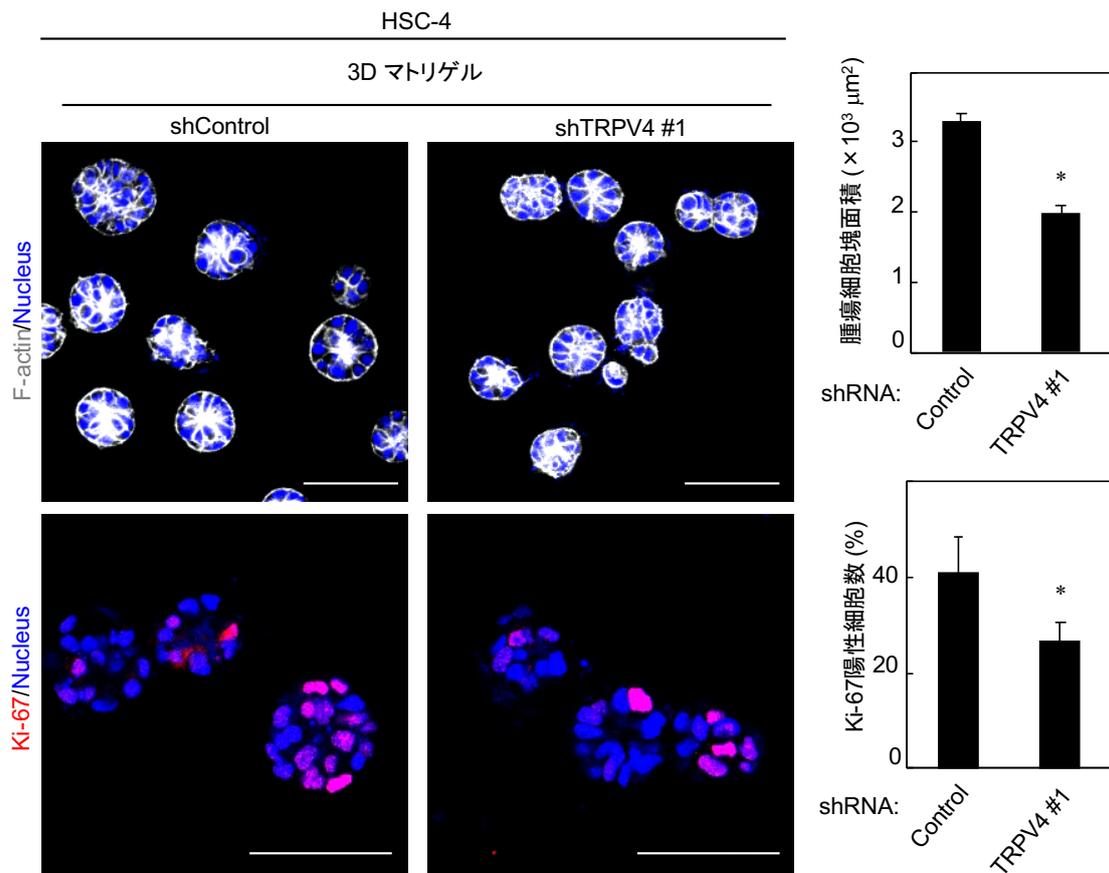


図 17 HSC-4 を用いた低接着培養と 2D 培養

(A) HSC-4 に TRPV4 shRNA #1 とコントロールを導入し、低接着性プラスチック皿にて 5 日間培養した。培養終了後 phalloidin と Hoechst 33342 で染色し、腫瘍細胞塊の面積を計測した ( $n = 25$ )。スケールバー:  $100 \mu\text{m}$

(B) HSC-4 に TRPV4 shRNA #1 とコントロールを導入し、2D プラスティック皿で 5% FBS 含有培地にて培養した。経日的な細胞数を計測した。



**図 18 HSC-4 を用いた 3D 培養**

HSC-4 に TRPV4 shRNA #1 とコントロールを導入し 3D マトリゲルにて 5 日間培養した。得られた腫瘍細胞塊の面積を測定した (n = 94)。また、培養終了後抗 Ki-67 抗体、Hoechst 33342 および phalloidin で染色し、Ki-67 陽性細胞数と Hoechst 33342 陽性細胞数 (n = 3,046) を計測した。全細胞数に対する Ki-67 陽性細胞数の割合をグラフに示す。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (\* $p < 0.01$ )

#### 4-9. *in vivo* において TRPV4 は腫瘍形成に関与する

次に、TRPV4 の発現が *in vivo* において腫瘍形成に与える影響について検討した。ヌードマウスの背部に腫瘍細胞を皮下移植してゼノグラフトモデルを作製し、検討を行った。TRPV4 shRNA #1 群では、形成された腫瘍の体積と重量がコントロール群と比較し抑制された (図 19)。移植後 14 日目に、形成された移植片を採取し免疫組織化学染色にて検討したところ、TRPV4 shRNA #1 群では腫瘍細胞の Ki-67 陽性細胞数が低下し、AKT のリン酸化が抑制されていた (図 20)。これらの結果から、TRPV4 の発現が *in vivo* における腫瘍形成に関与していると考えられた。

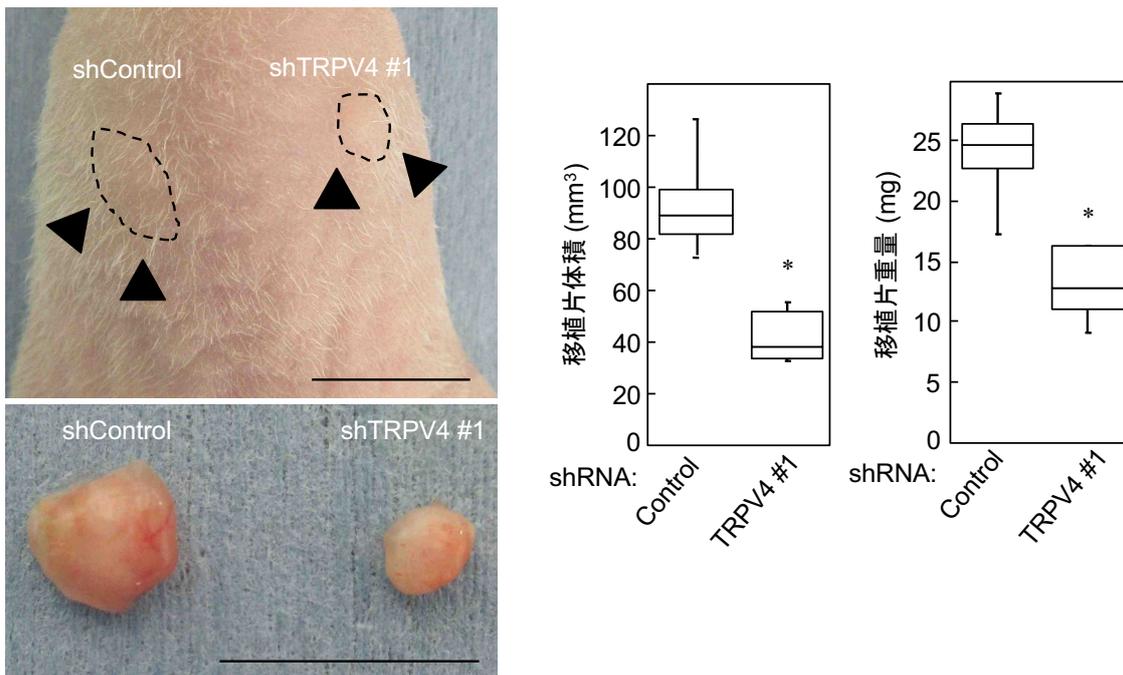


図 19 ノードマウスを用いたゼノグラフトモデルによる *in vivo* 実験

HSC-4 に TRPV4 shRNA #1 とコントロールを導入した。それぞれ  $5 \times 10^7$  個をヌードマウスの背部に皮下移植し (n = 6)、移植 14 日後に屠殺した。ある個体の外観と摘出した移植片を示す (左側)。摘出した移植片の体積と重量を測定した (右側)。

スケールバー: 1 cm (\* $p < 0.01$ )

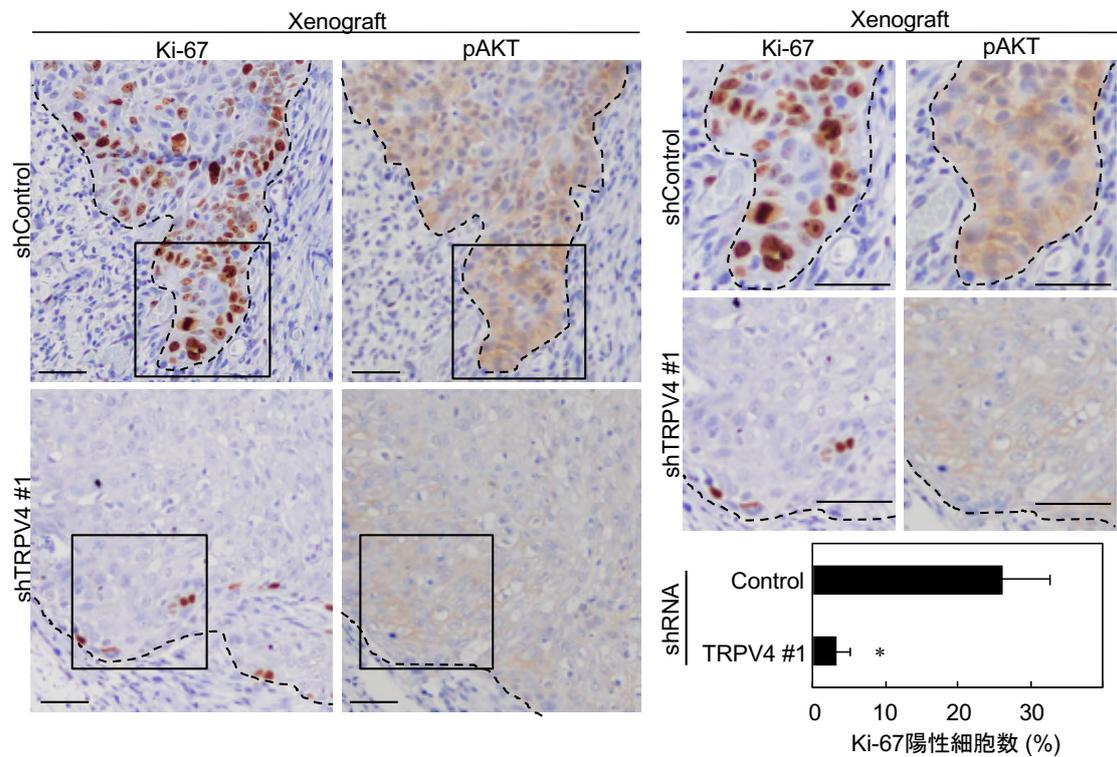


図 20 ゼノグラフトモデルにおける Ki-67 と pAKT 発現の免疫組織化学的検討

ヌードマウスから摘出した移植片を抗 Ki-67 抗体と抗 pAKT 抗体で免疫染色およびヘマトキシリンで核染色をした。Ki-67 陽性部位と pAKT 陽性部位を示す。ヘマトキシリン核染色細胞数 (n = 10,977) に対する Ki-67 陽性細胞数の割合をグラフに示す。

スケールバー: 50  $\mu$ m (\* $p$  < 0.01)

#### 4-10. TRPV4 はヒト OSCC において発現している

ヒト生検 OSCC 組織における TRPV4 の発現を調べるために、免疫組織化学染色にて検討した。TRPV4 の発現は、腫瘍部の 22/36 (61.1%)、非腫瘍部の 6/24 (25%) に認められた (図 21)。判定基準は、標本内における腫瘍部と非腫瘍部総面積の 20%を超える領域に染色性を示した場合に“発現陽性”と定義した。TRPV4 は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現しており、特に周囲の間質内に浸潤している腫瘍細胞において強発現していた (図 22)。本研究では、TRPV4 の発現強度により、weak、moderate および strong の 3 つに分類した (図 22, 23)。腫瘍部では、TRPV4 発現頻度と発現強度のいずれも、非腫瘍部と比較し高くなる傾向を認めた (図 21)。また、TRPV4 発現強度と T 分類、病期、組織学的悪性度およびリンパ節転移の有無などの臨床病理学的データとの間に相関は認めなかった (表 8)。以前の報告と同様に [38, 39]、pAKT の発現は腫瘍部の 14/36 (38.9%) で認めたが、非腫瘍部ではほとんど検出されなかった (図 24, 25)。さらに、腫瘍部における pAKT 発現頻度と TRPV4 発現強度との間に統計学的に有意な相関は認められなかったが、TRPV4 の発現を示す細胞には AKT のリン酸化が高頻度に認められた。これらの結果から、ヒト OSCC 組織においても、TRPV4 を介した AKT シグナル伝達が腫瘍増殖に関与していることが示唆された。一方、腫瘍部において、TRPV4 のみ、または pAKT のみを発現する症例も認められた (図 24, 25)。この結果から、TRPV4 以外のシグナル伝達を介した AKT シグナル伝達も腫瘍増殖に関与していると考えられた。また、非腫瘍部では TRPV4 の発現は認めたが、pAKT の発現はほとんど検出されなかった。このことから、腫瘍部においても TRPV4 を介した AKT の活性化には他の因子が必要であることが考えられたが、詳細は不明である。

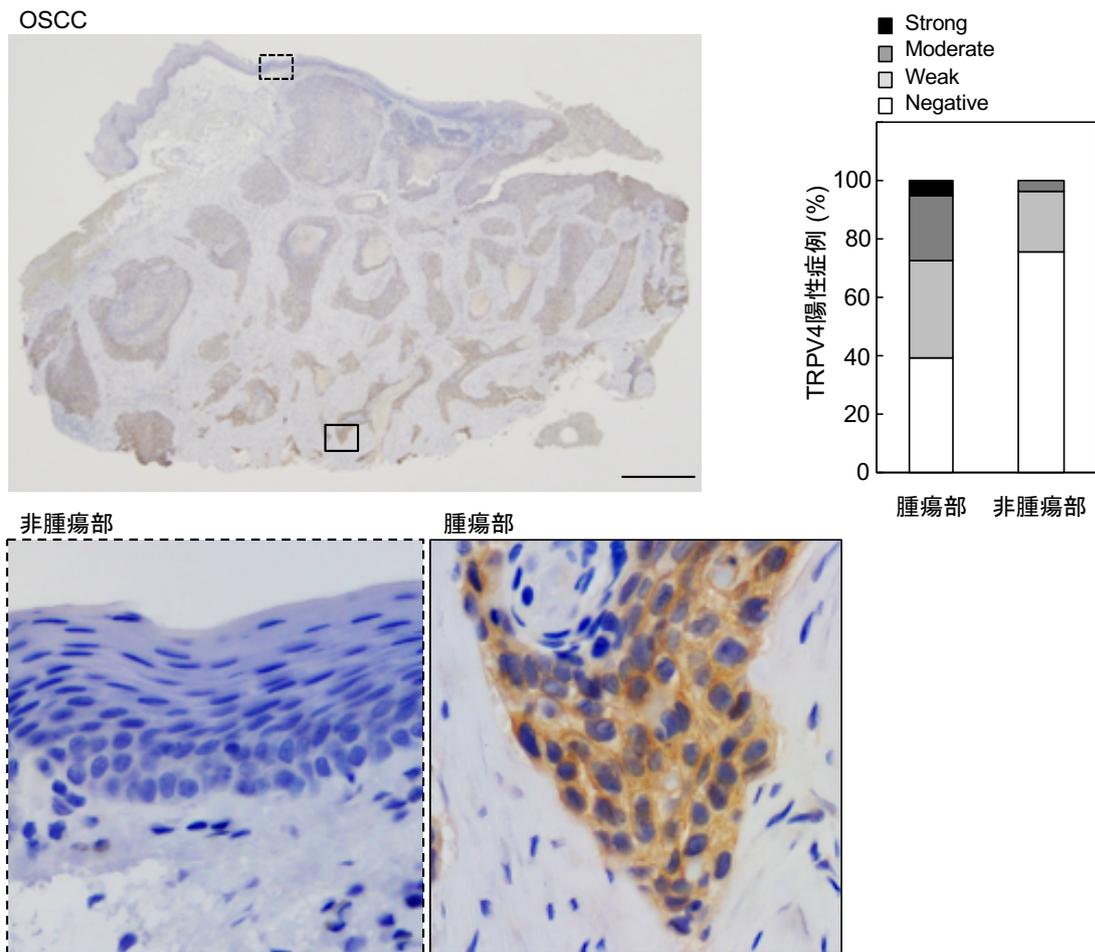


図 21 OSCC 組織における TRPV4 の発現様式と発現頻度

口腔扁平上皮癌組織標本（36 症例）を抗 TRPV4 抗体で免疫染色およびヘマトキシリンで核染色をした。TRPV4 発現強度により weak、moderate および strong の 3 つに分類した（図 22 参照）。破線ボックスと実線ボックスはそれぞれ非腫瘍部、腫瘍部の拡大像を示す。

スケールバー: 500  $\mu$ m

OSCC: 腫瘍部 (TRPV4発現強度)

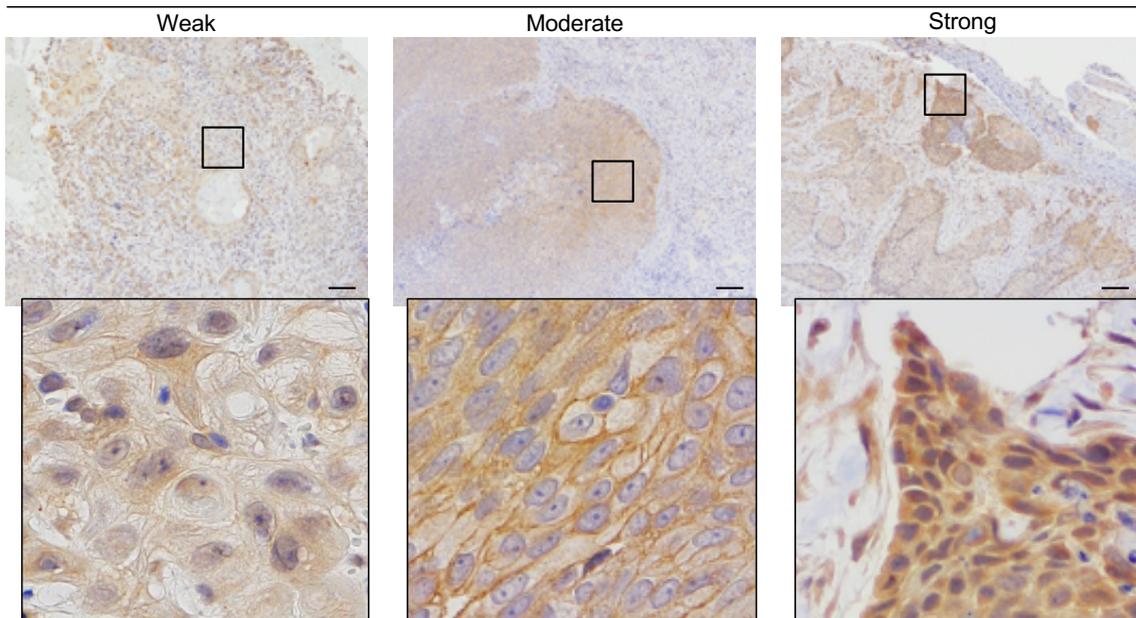


図 22 OSCC 組織中の腫瘍部における TRPV4 発現強度

TRPV4 の発現強度により weak、moderate および strong の 3 つに分類した。

スケールバー: 100  $\mu$ m

OSCC: 非腫瘍部 (TRPV4発現強度)

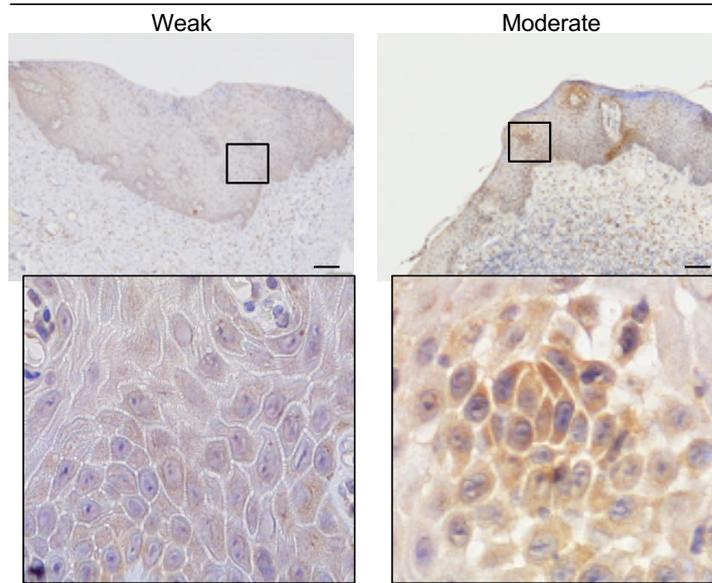
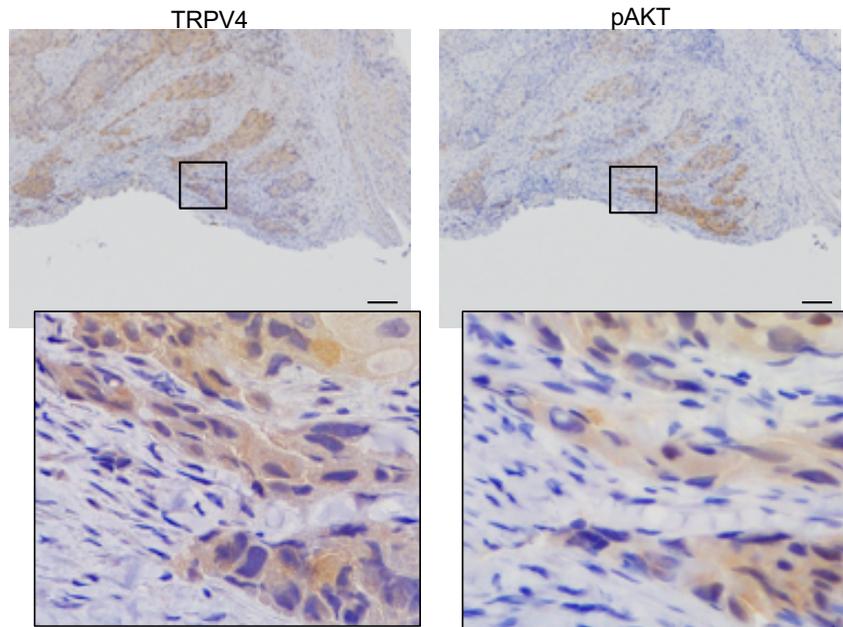


図 23 非腫瘍上皮における TRPV4 発現強度

TRPV4 の発現強度を示す。スケールバー: 100  $\mu$ m

OSCC: 腫瘍部

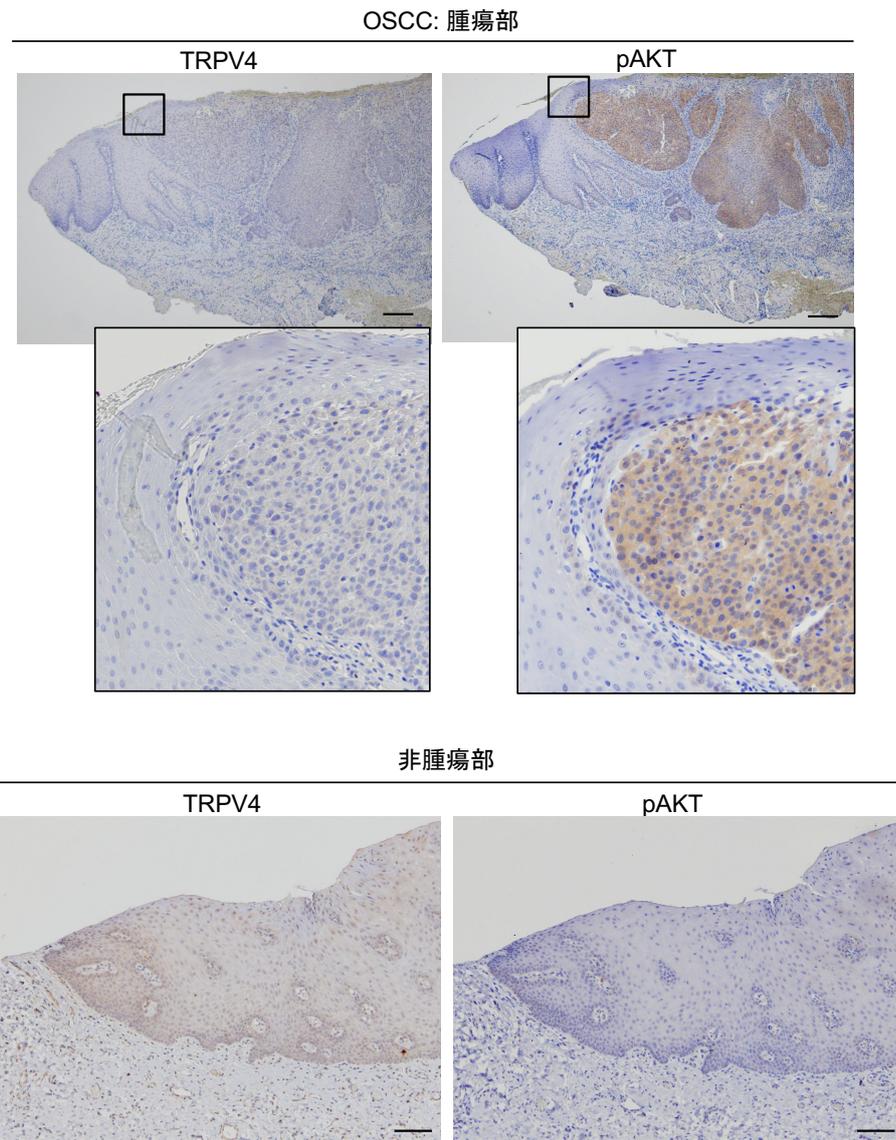


pAKT陽性症例
TRPV4陽性: 10/22 (45.5%)
TRPV4陰性: 4/14 (28.6%)

図 24 OSCC 組織における TRPV4 と pAKT の発現

口腔扁平上皮癌組織標本（36 症例）を抗 TRPV4 抗体と抗 pAKT 抗体で免疫染色およびヘマトキシリンで核染色をした。TRPV4 と pAKT 発現の内訳を示す。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  （有意差なし）



**図 25** OSCC 組織中の腫瘍部と非腫瘍部における TRPV4 と pAKT の発現様式

OSCC 組織中の腫瘍部と非腫瘍部における、TRPV4 と pAKT の染色態度を示す。

スケールバー: 上段; 200  $\mu$ m 下段; 100  $\mu$ m

表8: TRPV4の発現強度と臨床病理学的因子との関係

	TRPV4 発現強度					P 値
	-	Weak	Moderate	Strong		
<b>T 因子</b>						
T1	6	2	2	2	0	
T2	6	2	2	2	0	
T3	14	5	3	4	2	
T4	10	5	5	0	0	N.S.
<b>分化度</b>						
高分化	29	10	12	6	1	
中分化	5	2	0	2	1	
低分化	2	2	0	0	0	N.S.
<b>頸部リンパ節転移</b>						
有	9	2	6	0	1	
無	27	12	6	8	1	N.S.

Fisher の正確確率検定; N.S.: not significant

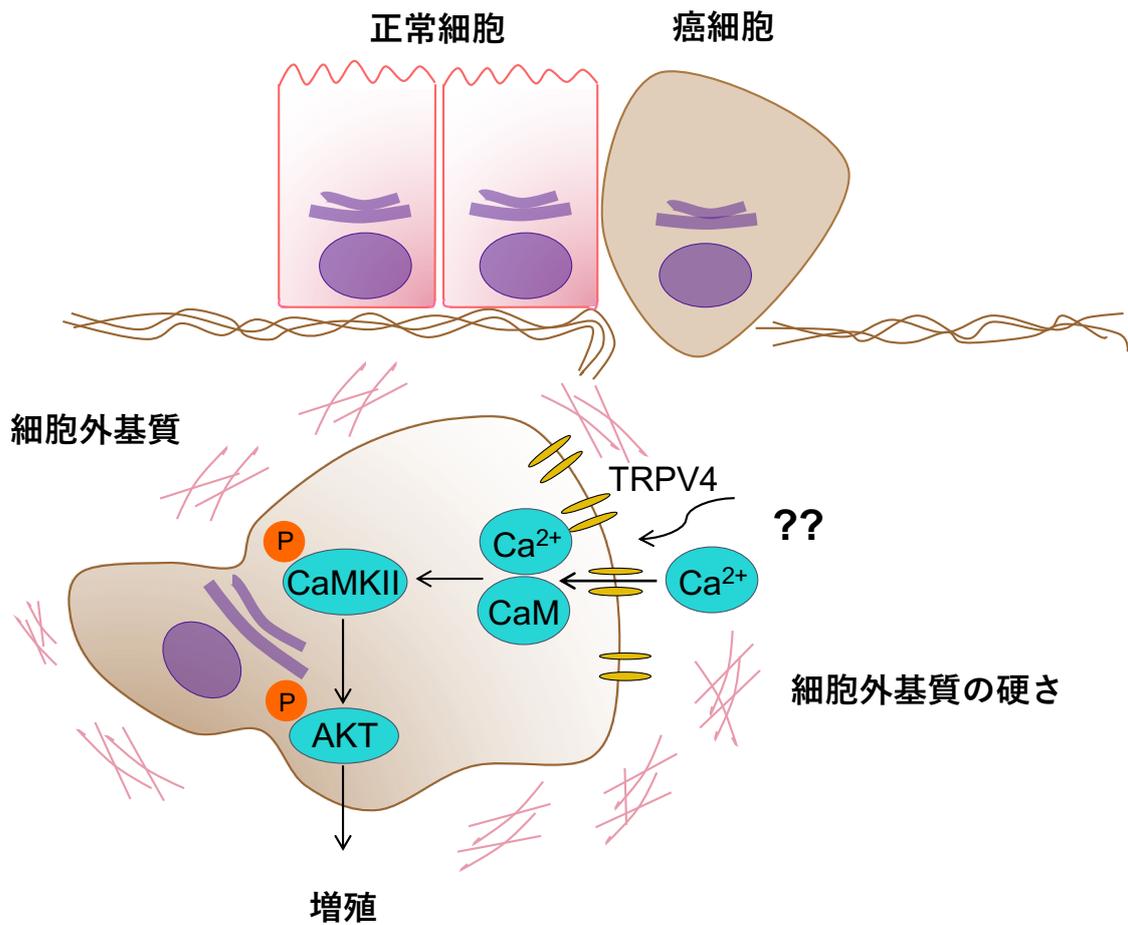


図 26 TRPV4/CaMKII/AKT シグナル伝達の様式図

本研究では、TRPV4 が細胞外基質の硬さなどの細胞外環境に応答し、Ca<sup>2+</sup>が細胞内流入すると、CaMKII を介した AKT シグナル伝達が活性化し、OSCC 細胞増殖が促進されることが示唆される。

## 5. 考 察

一般的に臨床では、腫瘍周囲は隣接する非腫瘍部周囲より硬い、すなわち硬結を触れることが知られている。例えば、乳癌では形質転換後、間質組織が次第に硬くなり、腫瘍細胞が腫瘍周囲の細胞外基質と相互作用し、 $\beta 1$  integrin-FAK-AKT シグナル伝達が活性化されると報告されている [40, 41]。同様に、直腸癌のマウス肝転移巣モデルでは、原子間力顕微鏡検査によって転移群の方が対照群より間質組織が硬いこと、また間質組織が硬いほど転移性増殖を促進することが報告されている [9]。これらの報告は、細胞外基質の硬さの増加が、悪性腫瘍の診断において重要な臨床所見であるだけでなく、腫瘍細胞の細胞内シグナル伝達を活性化することで腫瘍形成においても極めて重要な役割を果たすことを示唆している。したがって、細胞株を用いた癌研究は、生体の状況に類似した適切な細胞外環境下で実施する必要があると考えられた。一般的な細胞培養に用いられる 2D プラスティック皿の弾性率 ( $2.78 \times 10^9$  Pa) は、マウスの正常乳腺 ( $167 \pm 31$  Pa) と乳癌モデル ( $918 \pm 269$  Pa) の腫瘍間質の弾性率よりも著しく高いことが報告されている [42]。そのため、2D プラスティック皿で培養した腫瘍細胞は、*in vivo* の状況と異なる可能性がある。再構成基底膜 ( $175 \pm 37$  Pa) または 2.0 mg/ml コラーゲン ( $328 \pm 87$  Pa) を用いた 3D 培養の弾性率は、生体の乳癌における細胞外環境に類似している [42]。

本研究では、shRNA を用いて TRPV4 を KD すると、マトリゲルを用いた 3D 培養では OSCC 細胞の増殖能が低下したが、低接着培養や 2D 培養では増殖能において有意差は認められなかった。同様に、ゼノグラフトモデルでは、TRPV4 の発現が腫瘍形成に関与していることが明らかとなった。以上の結果から、TRPV4 が細胞外環境に応答し、*in vivo* での OSCC 細胞増殖を促進する可能性がある

考えられた。しかし、TRPV4 が 3D 培養、または *in vivo* 条件下で細胞外環境を感知する詳細な分子基盤は不明のままである。

これまでに、TRPV4 による  $\text{Ca}^{2+}$  流入依存性のシグナル伝達が、胃癌 [17, 18] では細胞増殖、浸潤、リンパ節転移および遠隔転移に、肝細胞癌 [19] では細胞増殖や細胞遊走に関与することや、乳癌において TRPV4 の過剰発現とそのシグナル伝達が予後不良と相関することが報告されている [34]。さらに、TRPV4 はマウスの海馬 [32]、内皮細胞 [33]、乳癌 [34] および神経膠腫細胞 [35] で AKT シグナル伝達を活性化することが報告されている。また、伸展による機械刺激は、TRPV4 を介した PI3K の活性化により毛細血管の配向性を誘導するという報告もある [43]。これらの報告と本研究の結果を鑑みると、TRPV4 は癌遺伝子関連分子として機能し、CaMKII を介して AKT シグナル伝達を活性化し、OSCC 細胞増殖に正の効果を及ぼすと考えられた。

さらに、免疫組織化学染色による検討により、ヒト OSCC 標本腫瘍部における TRPV4 の発現頻度と発現強度は、非腫瘍部よりも高いことを見出した。ヒト OSCC 標本非腫瘍部にも TRPV4 が発現することから、OSCC の治療において TRPV4 は分子標的としては不適であると予測される。また、pAKT は OSCC において予後因子の一つであり、局所再発率の高さや OSCC 患者の全生存率の低下と相関していた [38, 39]。TRPV4 の発現強度が高い腫瘍部において、AKT の活性化は高頻度に認められるのに対し、非腫瘍部ではほとんど検出されなかった。すなわち OSCC において、腫瘍周囲組織の硬さを含めた細胞外環境を TRPV4 が感知し、AKT シグナル伝達が活性化していると考えられた。また、臨床的に初診時と治療開始前の時点において、それぞれの硬結の程度と腫瘍の大きさを比較した場合、硬結の程度が増加する症例ほど腫瘍が増大する傾向を認めている（未発表）。これらの結果は、腫瘍周囲組織の硬さを低下させ細胞外

環境を変化させることが、ヒト OSCC の新規抗腫瘍効果となる可能性があることを示している。一方で、TRPV4 の発現を認めない腫瘍細胞における pAKT 発現の上昇は、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 3-キナーゼ触媒サブユニット  $\alpha$  (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha: PIK3CA) の変異など、他のメカニズムによって制御されている可能性が考えられた [44]。

さらに、共同研究者として参画した研究プロジェクトでは、細胞外環境が OSCC 細胞を活性化する新規分子を同定することを目的として、浮遊培養を用いた検討を行なった。その結果、Hippo 経路の転写共役因子 YAP が転写因子 TEAD4 を介して、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル PIEZO1 の発現を制御することで、OSCC 細胞増殖を促進することを見出した [45]。これらの研究から、OSCC において  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介する異常に活性化した細胞内シグナル伝達が細胞増殖に影響を与えると予測され、より詳細な分子基盤を解明することで  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを標的とした新規治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

以上より、TRPV4 は、複数の OSCC 細胞株とヒト OSCC で発現しており、*in vitro* と *in vivo* において、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルである TRPV4 が細胞外環境に応答し、CaMKII を介して AKT シグナル伝達を活性化し、OSCC 細胞増殖を促進すると考えられた (図 26)。そして、腫瘍細胞周囲の細胞外環境によって活性化される TRPV4/CaMKII/AKT シグナル伝達が、OSCC 腫瘍細胞の増殖に寄与していると考えられる。

## 6. 謝 辞

本研究は、九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野 清島 保 教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の懇篤な御指導、御助言ならびに御校閲に深く感謝致します。また、このような研究の場を与えて頂きました国立病院機構 九州医療センター 歯科口腔外科 吉川 博政 部長ならびに大関 悟 口腔腫瘍統括長に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、直接厳しい御指導、御助言を賜りました九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野 藤井 慎介 講師に厚く感謝いたします。さらに、実験手法の御指導と御助言を賜り、いつも研究を支えてくださいました九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野 永田 健吾 助教、和田 裕子 助教、長谷川 佳那 助教に心より感謝申し上げます。また、常に研究の協力ならびに励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。最後に研究を陰ながら支えてくれた家族に感謝します。

## 7. 参考文献

- [1] Takata T and Slootweg PJ. Tumours of the oral cavity and mobile tongue. Solan P, Gale N, Hunter K, Lingen M, Nylander K, Reibel J, et al. Malignant surface epithelial tumours. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017. p.108-111.
- [2] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16.
- [3] Sinevici N, O'Sullivan J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncol* 2016;61:12-8.
- [4] Omar E. Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma--a systematic review. *Head Face Med* 2015;11:6.
- [5] Reddavid R, Sofia S, Chiaro P, Colli F, Trapani R, Esposito L, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake? *World J Gastroenterol* 2018; 14:274-89.
- [6] Miao ZF, Liu XY, Wang ZN, Zhao TT, Xu YY, Song YX, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy in patients with gastric cancer: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *BMC cancer* 2018;31:118.
- [7] Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:802-12.
- [8] Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891-906.

- [9] Dou C, Liu Z, Tu K, Zhang H, Chen C, Yaqoob U, et al. P300 Acetyltransferase mediates stiffness-induced activation of hepatic stellate cells into tumor-promoting myofibroblasts. *Gastroenterology* 2018;154:2209-.e14.
- [10] Adapala RK, Thoppil RJ, Ghosh K, Cappelli HC, Dudley AC, Paruchuri S, et al. Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene* 2016;35:314-22.
- [11] Meng Z, Qiu Y, Lin KC, Kumar A, Placone JK, Fang C, et al. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. *Nature* 2018;560:655-60.
- [12] Garcia-Elias A, Mrkonjić S, Jung C, Pardo-Pastor C, Vicente R, Valverde MA. The TRPV4 channel. *Handb Exp Pharmacol* 2014;222:293-319.
- [13] Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, et al. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1495-502.
- [14] Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, et al. TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H466-76.
- [15] Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:47044-51.
- [16] Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 2000;103:525-35.
- [17] Xie R, Xu J, Xiao Y, Wu J, Wan H, Tang B, et al. Calcium promotes human gastric cancer via a novel coupling of calcium-sensing receptor and TRPV4 channel. *Cancer*

Res 2017;77:6499-512.

- [18] Tang B, Wu J, Zhu MX, Sun X, Liu J, Xie R, et al. VPAC1 couples with TRPV4 channel to promote calcium-dependent gastric cancer progression via a novel autocrine mechanism. *Oncogene* 2019;38:3946-61.
- [19] Fang Y, Liu G, Xie C, Qian K, Lei X, Liu Q, et al. Pharmacological inhibition of TRPV4 channel suppresses malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma via modulation of ERK signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2018;101:910-9.
- [20] Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, Nakabeppu Y, Ohishi M. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. *Am J Pathol* 2000;156:1317-26.
- [21] Kibe T, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Chen L, Habu M, et al. Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes. *Oral Sci Int* 2011;8:20-8.
- [22] Kitsuki T, Yoshimoto RU, Aijima R, Hatakeyama J, Cao AL, Zhang JQ, et al. Enhanced junctional epithelial permeability in TRPV4-deficient mice. *J Periodontal Res* 2020;55:51-60.
- [23] Matsumoto S, Fujii S, Sato A, Ibuka S, Kagawa Y, Ishii M, et al. A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J* 2014;33:702-18.
- [24] Mikami Y, Fujii S, Nagata K, Wada H, Hasegawa K, Abe M, et al. GLI-mediated Keratin 17 expression promotes tumor cell growth through the anti-apoptotic function in oral squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143:1381-93.

- [25] Takayama Y, Furue H, Tominaga M. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities. *Sci Rep* 2017;7:43132.
- [26] Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998;72:8150-7.
- [27] Fujii S, Shinjo K, Matsumoto S, Harada T, Nojima S, Sato S, et al. Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3'-untranslated region, promotes tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:81571-87.
- [28] Fujii S, Nagata K, Matsumoto S, Kohashi KI, Kikuchi A, Oda Y, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development. *Sci Rep* 2019;9:4257.
- [29] Fujii S, Matsumoto S, Nojima S, Morii E, Kikuchi A. Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. *Oncogene* 2015;34:4834-44.
- [30] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. Head and Neck tumours. In: Brierley JD, Gospodarowicz MK, and Wittekind C editors. *TNM classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell 2017. p.17-21.
- [31] Mikami Y, Fujii S, Kohashi KI, Yamada Y, Moriyama M, Kawano S, et al. Low-grade myofibroblastic sarcoma arising in the tip of the tongue with intravascular invasion: A case report. *Oncol Lett* 2018;16:3889-94.
- [32] Jie P, Hong Z, Tian Y, Li Y, Lin L, Zhou L, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating

- PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways. *Cell Death Dis* 2015;6:e1775.
- [33] Xu S, Liu B, Yin M, Koroleva M, Mastrangelo M, Ture S, et al. A novel TRPV4-specific agonist inhibits monocyte adhesion and atherosclerosis. *Oncotarget* 2016;7:37622-35.
- [34] Lee WH, Choong LY, Jin TH, Mon NN, Chong S, Liew CS, et al. TRPV4 plays a role in breast cancer cell migration via Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of AKT and downregulation of E-cadherin cell cortex protein. *Oncogenesis* 2017;6:e338.
- [35] Ou-Yang Q, Li B, Xu M, Liang H. TRPV4 promotes the migration and invasion of glioma cells via AKT/Rac1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503:876-81.
- [36] Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem* 2017;141:808-18.
- [37] Perez-Garcia MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Commella JX, Soler RM. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2004;279:6132-42.
- [38] Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1199-205.
- [39] Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Egleston BL, Speier WF 4th, Haffy B, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:553-8.

- [40] Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:108-22.
- [41] Rubashkin MG, Cassereau L, Bainer R, DuFort CC, Yui Y, Ou G, et al. Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res* 2014;74:4597-611.
- [42] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8:241-54.
- [43] Thodeti CK, Matthews B, Ravi A, Mammoto A, Ghosh K, Bracha AL, et al. TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. *Circ Res* 2009;104:1123-30.
- [44] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015;517:576-82
- [45] Hasegawa K, Fujii S, Matsumoto S, Tajiri Y, Kikuchi A, Kiyoshima T. YAP signaling induces PIEZO1 expression to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *J Pathol* 2021;253:80-93.