

学位論文

口腔扁平上皮癌における Neurokinin 3 Receptor の機能的役割と
Fezolinetant の抗腫瘍効果の検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

口腔顎顔面外科学分野

福嶋 輝保

緒 言

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) は顎口腔領域に発生する代表的な悪性腫瘍であり、喫煙や飲酒、高齢化に伴い新規罹患者数は世界的に増加傾向にある^{1,2,3)}。OSCC に対する治療は、切除可能例では外科療法が第一選択であるが、摂食・嚥下・発音などの機能面や整容面に重大な影響を及ぼすことが多い。一方、局所進行例や再発・転移例に対しては、化学療法や放射線治療が単独あるいは併用で行われるものの、化学療法単独での根治は困難とされている^{3,4,5)}。OSCC の化学療法における主要治療薬には、従来から用いられているシスプラチンなどの殺細胞性抗がん薬のほか、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬がある。そのうち分子標的治療薬は、肺癌や乳癌などでは多くの薬剤が臨床応用されているが、OSCC に対しては上皮細胞増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) を標的とするセツキシマブのみである^{6,7)}。

Neurokinin B (NKB) は Substance P (SP) や Neurokinin A (NKA) などとともにタキキニンファミリーに所属する神経ペプチドの一つである。同ファミリーの受容体には Neurokinin-1,-2,-3 receptor (NK-1R, NK-2R, NK-3R) が存在し、NKB は特に NK-3R に高い親和性を有する。生体内では NKB が視床下部弓状核に存在する KNDy (kisspeptin, neurokinin B, dynorphin) ニューロン上の NK-3R に作用することで、性腺刺激ホルモン放出ホルモンのパルス分泌を調節し、性ホルモン分泌に関与する視床下部-下垂体-性腺軸に影響を及ぼしている (図 1)⁸⁻¹⁰⁾。

OSCC の微小環境に関する研究を進める中で、OSCC 患者の腫瘍組織中に NK-3R の発現上昇を認めた。さらに OSCC 細胞株である HSC2 に NKB を添加することで、NK-3R 遺伝子の発現亢進および PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化を介して、細胞の増殖能や遊走能および浸潤能が亢進することを見出した。これらの結果から、NKB-NK-3R 系は OSCC の進展に深く関与する新たな分子機構であり、NK-3R は新規治療標的分子候補になることを明らかにした¹¹⁻¹³⁾。

今回、複数の OSCC 細胞株に NKB を添加し、各種腫瘍細胞の NKB 反応性の違いを検討するとともに、近年臨床応用された NK-3R アンタゴニスト Fezolinetant を用いて腫瘍進行に対する抑制効果を評価した。さらに、腫瘍細胞における NK-3R 発現の有無が病態や予後に及ぼす影響を、臨床検体を用いて統計学的に検討することで、NKB-NK-3R 系が OSCC に与える影響や、Fezolinetant が OSCC に対する新規のがん化学療法の候補となりうる可能性を明らかにすることを目的とした。

材料ならびに方法

1. 細胞培養

ヒト OSCC 細胞株 (HSC2, HSC3, SAS, Ca9-22, HSC3-M3, OSC-19) は JCRB 細胞バンクより入手した。HSC3-M3 は、HSC3 を親株とした高転移性株である。各細胞株は、5% CO₂, 37°C の加湿雰囲気下において、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, MO, USA) と 1% penicillin/streptomycin (Gibco, NY, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation., Osaka, Japan) を用いて培養した。

2. 増殖能の評価

各細胞株を 6 ウェルプレートに播種し、NKB (0, 0.01, 0.1, 1.0 μM; Peptide Institute, INC., Osaka, Japan) を添加した DMEM 培地で培養した。加えて Fezolinetant の投与により増殖能がどのように変化するかを確認するため、HSC2, HSC3, HSC3-M3 に対して、NKB 0.1 μM と Fezolinetant (0, 0.01, 0.1, 1.0 μM; MedChemExpress, NJ, USA) を併用添加した DMEM 培地を用いて培養した。培地は 24 時間ごとに交換し、1 週間後に細胞を回収した。細胞数は TC20™ 自動セルカウンター (Bio-Rad, CA, USA) を用いて測定した。

3. 遊走能の評価

各細胞株を6ウェルプレート上でサブコンフルエントまで培養後、200 μ L ピペットチップで単一の創傷ギャップを形成した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、NKB (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を含む DMEM 培地を加えた。12 時間後に創傷部位を撮影し、創傷部面積の減少量を測定した。また HSC2, HSC3, HSC3-M3 では、NKB 0.1 μ M と Fezolinetant (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を併用添加した DMEM 培地を用いて、同様の実験を行った。

4. 浸潤能の評価

Corning® BioCoat® Matrigel Invasion Chamber 24-Well Plate, 8.0 Micron (Corning, NY, USA) を用い、メーカーのプロトコルに従って浸潤能の評価を行った。上室には無血清 DMEM に懸濁した 2.0×10^4 個の細胞を播種し、下室には NKB (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を含む DMEM 培地を添加した。5% CO₂, 37°C で 36 時間培養後、上側チャンバーを Diff-Quik (Sysmex CORPORATION., Hyogo, Japan) で固定・染色し、マトリゲルを通過した細胞数を位相差顕微鏡で計測した。また、HSC2, HSC3, HSC3-M3 では、NKB 0.1 μ M と Fezolinetant (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を併用した培地を用いて、同様の実験を行った。

5. ウェスタンブロット法

HSC3-M3 をサブコンフルエントまで培養後、0.1 μ M の NKB を含む DMEM を添加した。氷冷した PBS で 3 回洗浄し、RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, INC., TX, USA) と Phosphatase Inhibitor Cocktail (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan) を加え、セルスクレーパーで細胞を回収した。4°C, 15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を採取した。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific INC., MA, USA) を用いて計測した。総タンパク質 18 μ g を含む細胞溶解液を Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) と混合し変性させた後、Mini-PROTEAN TGX Gels (Bio-Rad) で電気泳動し、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) を用いてメンブレンに転写した。メンブレンは 5% BSA を含む Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) で室温 1 時間ブロッキング後、一次抗体を含む TBS-T に浸し 4°C で一晩インキュベートした。その後、二次抗体を用いて Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) で検出した。同様の手順で、NKB 0.1 μ M と Fezolinetant 1.0 μ M の併用刺激群についても解析を行った。使用した抗体を表 1 に示す。

6. 免疫組織化学染色

対象は、2014 年 4 月 1 日から 2022 年 3 月 31 日の 8 年間に岡山大学病院を受診し、舌、下顎歯肉、上顎歯肉、頬粘膜、口底または口蓋の OSCC と診断され、外科的切除を受けた 60 歳以上の症例とした。60~91 歳の男性 35 症例、女性 31 症例の計 66 症例を用いた。切除標本を用いて免疫組織化学染色を行い、NK-3R の発現と予後との関連を評価した。なお、再発例および術前に化学療法や放射線治療などの補助療法を施行した症例は除外した。

切片は、キシレン (Sigma-Aldrich) および 100% エタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて脱パラフィン処理を行い、メタノール含有 1.25% 過酸化水素水 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。抗原賦活化は圧力加熱処理法を用い、クエン酸 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) およびクエン酸三ナトリウム二水和物 (KANTO CHEMICAL CO., INC., Tokyo, Japan) から作製した pH 6.0 クエン酸緩衝液で 15 分間加熱処理を行った。室温に戻した後、ImmPRESS Peroxidase Universal Polymer kit (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG; Vector Laboratories, INC., CA, USA) の Normal Horse Serum (2.5%) で 20 分間ブロッキングを行った。一次抗体には Anti-Neurokinin B receptor Antibody (Thermo Fisher Scientific INC.) を用い、4°C 湿潤環境下で一晩インキュベートした。PBS で洗浄した後、二次抗体反応には、ImmPRESS Universal Polymer kit, Peroxidase (Vector Laboratories, INC.) の Polymer Reagent (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG) を用い、30 分間室温で反応させた。可視化には ImmPACT DAB Chromogen (Vector Laboratories, INC.) を使用し、Mayer's Hematoxylin (MUTO

PURE CHEMICALS CO., LTD., Tokyo, Japan) で対比染色を行った。脱水、透徹処理後、キシレンで封入した。

7. 統計解析

増殖能 遊走能, 浸潤能の結果については, NKB 非投与群に対する投与群 (0.01, 0.1, 1.0 μM) , Fezolinetant 非投与群に対する投与群 (0.01, 0.1, 1.0 μM) の変化を Dunnett 法で多重比較した。免疫組織化学染色の結果は, NK-3R 陽性群と陰性群の 2 群に分けて解析した。性別, 年齢, 発生部位, 口腔癌診療ガイドライン 2023 年版に則した Stage 分類, T 分類, N 分類, 頸部リンパ節外浸潤 (extranodal extension : ENE), 腫瘍サイズ, 1 年生存率 (Overall Survival : OS) の 9 項目を評価項目とした。単変量解析では, 名義変数に Fisher の正確比検定, 連続変数に t 検定を用いた。多変量解析はロジスティック回帰分析を用い, 変数選択は赤池情報量基準 (AIC) による Stepwise 法を用いた。統計解析ソフトは R および GraphPad Prism Ver.10 を使用し, 有意水準は 5%とした。

結果

1. NKB はヒト OSCC 細胞株の増殖能, 遊走能および浸潤能を促進する

NKB のヒト OSCC 細胞株に対する増殖・遊走・浸潤における役割を検討するために, 各種ヒト OSCC 細胞株に NKB を添加し評価した。その結果, 全てのヒト OSCC 細胞株において, NKB は増殖能, 遊走能および浸潤能の亢進が認められ, これらの促進効果は NKB の濃度依存的に誘導された。特に HSC3, HSC3-M3 では, 増殖能, 遊走能, 浸潤能すべてにおいて有意な上昇が認められた。一方, SAS では増殖能のみが有意に亢進し, OSC-19 および Ca9-22 では増殖能および遊走能において有意な上昇が認められたが, 浸潤能の変化は限定的であった。各細胞株において, 最も顕著な促進効果を示した NKB の濃度は 0.1 μM であった (図 2A, 2B, 2C)。

2. Fezolinetant は NKB によるヒト OSCC 細胞株の機能亢進を抑制する

NKB により誘導されるヒト OSCC 細胞株の各種機能亢進が, NK-3R に介したものであるか検討するために, NKB 0.1 μM での刺激下にて NK-3R アンタゴニストである Fezolinetant を用い, 各種機能の変化を評価した。全てのヒト OSCC 細胞株において, Fezolinetant は濃度依存的に NKB による増殖能, 遊走能, 浸潤能の亢進を抑制した。特に遊走能および浸潤能に対する抑制効果は顕著であった。一方, 増殖能については抑制傾向を示したものの, 一部の細胞株では有意差に至らなかった。Fezolinetant の抑制効果は, 0.01 μM または 0.1 μM で最も強く認められた (図 3A, 3B, 3C)。

3. NKB は PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を活性化し, Fezolinetant はその伝達経路を抑制する

NKB によるヒト OSCC 細胞株機能の変化に関与する細胞内情報伝達系を明らかにするため, NKB 刺激後の PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化について検討した。HSC3-M3 を 0.1 μM の NKB で刺激したところ, 刺激開始 1 分後より Akt のリン酸化が認められ, 30 分後に最大となった。また mTOR のリン酸化も刺激開始 1 分後から増強し, Akt と同様に時間依存的変化を示した (図 4A)。一方, NKB 0.1 μM と Fezolinetant 1.0 μM を併用した場合, 刺激開始 20 分までは Akt および mTOR のリン酸化が抑制された (図 4B)。

4. NK-3R の発現量は頸部リンパ節の節外浸潤と密接に関連する

In vitro で得られた知見の臨床的意義を検討するため, OSCC 臨床検体における NK-3R 発現と病理学的因子および予後との関連を解析した。免疫組織化学染色の結果, 66 症例は NK-3R 陽性群 (n = 23) と陰性群 (n = 43) の 2 群に分類された。単変量解析を行った結果, NK-3R 陽性群は陰性群と比較して以下の特徴を示した (図 5) (表 2)。

①女性が多い (65.2% vs 37.2%, p = 0.04)。②腫瘍最大径が大きい (29 mm vs 23.5 mm, p = 0.03)。③N 分類が

進行していた (N0: 60.9% vs 83.7%, N3b: 26.1% vs 2.3%, $p = 0.02$). ④Stage が進行していた (Stage I: 4.3% vs 34.9%, Stage IVB: 26.1% vs 4.7%, $p < 0.01$). ⑤頸部リンパ節外浸潤率が高い (35.3% vs 4.3%, $p = 0.03$). ⑥1年 OS が有意に低下していた (1-year OS: $p = 0.02$).

NK-3R 発現の有無を目的変数とした多変量解析では、ENE と性別の 2 因子が抽出され、ENE が有意な因子として抽出された ($OR = 12.80$, $95\%CI = 1.28 - 128.00$, $p = 0.03$).

考察

OSCC に対する化学療法として、従来よりシスプラチンやカルボプラチンなどのプラチナ製剤を主体とした殺細胞性抗がん薬が用いられてきた。その後 OSCC 細胞が高率に EGFR を発現していることから EGFR を標的とした分子標的治療薬のセツキシマブが開発された。同剤の作用機序としては、EGF(epidermal growth factor)の EGFR への結合を阻害し、細胞増殖、細胞生存、細胞運動、腫瘍内血管新生など、腫瘍増殖・転移に関与する多くの細胞機能を抑制し、抗腫瘍効果を発揮することに加え、抗体依存性細胞傷害を誘導することや、既存の殺細胞性抗がん薬の抗腫瘍効果を増強し、奏効率を向上させることが報告されている^{14,15}。しかしセツキシマブ以降、OSCC に対して臨床応用された分子標的治療薬は存在せず、新規治療標的の提案が喫緊の課題である。

体温調節中枢を構成する KNDy ニューロンで合成された NKB がオートクライン的に NK-3R に作用することで、体温調節に関与している。しかし更年期移行期はエストロゲン低下により、NKB-NK-3R 系の活性化が抑制されなくなり、体温調節機能が低下しホットフラッシュなどの血管運動神経症状を引き起こす^{8,10}。これに対し開発されたのが NK-3R アンタゴニストの Fezolinetant で、2023 年にアメリカ食品医薬品局により VEOZAH™として承認された¹⁶。

タキキニンファミリーは多くの悪性腫瘍と密接に関与していることが報告されている。OSCC では NK-1R が発現しており、SP が NK-1R を介して OSCC 細胞の増殖・浸潤などの機能を制御している¹²。本研究では過去の報告をもとに複数のヒト OSCC 細胞株を用いて NKB および NK-3R 拮抗薬である Fezolinetant の影響を検討した。その結果、HSC3 や HSC3-M3 では、NKB が濃度依存的に増殖能・遊走能・浸潤能を有意に促進したものの、Ca9-22 や OSC-19, SAS は増殖能・遊走能のみ有意に促進した (図 2)。さらに Fezolinetant は NKB によって誘導された遊走能および浸潤能の上昇を、濃度依存的に有意に抑制した一方、増殖能については抑制傾向を示したものの、統計学的に有意な抑制は認められなかった (図 3)。OSCC における増殖能、遊走能、浸潤能といった細胞機能は、NK-3R を含む多様な膜受容体を介した細胞内情報伝達系を通じて、各種サイトカインやケモカインの分泌が誘導されることで制御されている^{17,18}。また NKB は内因性アゴニストとして NK-3R に対して高い結合親和性を有しているが、他のタキキニンファミリーである SP や NKA も NK-3R に対して結合能力を有し、さらに NKB 自体も NK-1R や NK-2R に対して部分的な作用を示すことが明らかとなっている^{19,20}。以上のことから、本研究において NKB による各能力の上昇および Fezolinetant による抑制が細胞株によって異った要因として、腫瘍の発生部位や細胞特性の違いに加え、各細胞株における NK-3R 発現量やシグナル伝達経路の活性化状態の差異、さらにタキキニン受容体間のクロストークが関与している可能性が考えられる。

病理組織学的に NK-3R 発現陽性は陰性と比較し、単変量解析ではより進行した N 分類および Stage 分類を有する症例、ENE を伴う症例、さらに 1 年 OS が短い症例が有意に多かった (表 2)。多変量解析では ENE が独立した有意因子として特定された。OSCC では頸部リンパ節転移の有無は予後と強く関与しており、転移リンパ節が存在すると生存率が 50%低下すると報告されている²¹。本研究の結果は、NK-3R 発現が腫瘍の進行度と密接に関連し、進行癌ほどその発現が増強されることが示唆された。

PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路は、細胞の増殖・生存・代謝・転移などのがんの基本的な生物学的プロセスを制御する重要な経路である。これらのシグナル伝達経路の変異は OSCC を含む多くの悪性腫瘍において、腫瘍の進行や治療抵抗性に関与している²²。本研究では NKB は PI3K の下流にある Akt, mTOR のリン酸化を促進し、Fezolinetant はそれらを抑制することが明らかとなった。これは NKB-NK-3R 系が

PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を活性化することで腫瘍微小環境における腫瘍細胞の生存や代謝、転移等が亢進し、一方で Fezolinetant が NK-3R を阻害することで、腫瘍細胞の各能力を抑制していることを示している。近年 PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を標的とした新たながん化学療法の開発が進んでおり、Fezolinetant も同経路を標的とした OSCC に対する新規治療薬の候補になりうることを示唆された²³⁾。

本研究により、NKB は多くの OSCC 細胞株において増殖能や遊走能、浸潤能を有意に亢進させること、そして Fezolinetant は Akt および mTOR のリン酸化を抑制することで、これらの能力の亢進を有意に抑制することが示された。さらに NK-3R の発現の有無は OSCC の予後に関わる各種臨床因子と密接に関連していることも明らかとなった。今後、PI3K/Akt/mTOR 以外のシグナル伝達経路への NKB-NK-3R 系の影響や、腫瘍微小環境におけるサイトカインやケモカイン産生への関を検討する必要がある。加えて OSCC モデルマウスに対して Fezolinetant の単剤あるいは既存の殺細胞性抗がん薬等との併用による抗腫瘍効果、さらには安全性や副作用についても検討する必要がある。将来的には NK-3R を標的とした新規のがん化学療法の開発が、局所進行例や再発・転移例に対する新たな治療選択肢となり OSCC 全体の治療成績や予後の向上に寄与することが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご指導とご校閲を賜りました岡山大学学術研究院 医歯薬学域 口腔顎顔面外科学分野の伊原木聡一郎教授に、心より感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり終始懇切なるご指導を頂きました岡山大学学術研究院 医歯薬学域 口腔顎顔面外科学分野の角谷宏一先生に深く御礼を申し上げます。

参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-249.
2. Tan Y, Wang Z, Xu M, Li B, Huang Z, Qin S, Nice EC, Tang J, Huang C. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci.* 2023; 15(1), 44.
3. Colevas AD, Cmelak AJ, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, et al. NCCN Guidelines® Insights: head and neck cancers, Version 2. 2025. *J Natl Compr Canc Netw.* 2025; 23(2): 2-11.
4. Johnson DE, Burtneiss B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020; 6(1): 92.
5. Mohamad I, Glaun MDE, Prabhash K, Busheri A, Lai SY, Noronha V, Hosni A. Current treatment strategies and risk stratification for oral carcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2023; 43: e389810.
6. Tahara M, Kiyota N, Yokota T, Hasegawa Y, Muro K, et al.. Phase II trial of combination treatment with paclitaxel, carboplatin and cetuximab (PCE) as first-line treatment in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CSPOR-HN02). *Ann Oncol.* 2018; 29(4): 1004-1009.
7. 口腔癌診療ガイドライン改訂合同委員会. 第1章 栗田浩, 鶴沢成一, 口腔癌診療ガイドライン 2023 年版. 東京, 金原出版株式会社, 2023, 60-61.
8. Rance NE, Dacks PA, Mittelman-Smith MA, Romanovsky AA, Krajewski-Hall SJ. Modulation of body temperature and LH secretion by hypothalamic KNDy (kisspeptin, neurokinin B and dynorphin) neurons: A novel hypothesis on the mechanism of hot flushes. *Front Neuroendocrinol.* 2013; 34(3): 211-227.
9. Anderson RA, Millar RP. The roles of kisspeptin and neurokinin B in GnRH pulse generation in humans, and their potential clinical application. *J Neuroendocrinol.* 2022; 34(5): e13081.

10. Johnson KA, Martin N, Nappi RE, Neal-Perry G, Shapiro M, et al. Efficacy and safety of Fezolinetant in moderate to severe vasomotor symptoms associated with menopause: A phase 3 RCT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023; 108(8): 1981-1997.
11. Obata K, Shimo T, Okui T, Matsumoto K, Takada H, et al. Tachykinin receptor 3 distribution in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2016; 36(12): 6335-6341.
12. Obata K, Shimo T, Okui T, Matsumoto K, Takada H, et al. Role of neurokinin 3 receptor signaling in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2017; 37(11): 6119-6123.
13. Yoshida S, Shimo T, Takabatake K, Murase Y, Obata K, et al. Expression of neurokinin B receptor in the gingival squamous cell carcinoma bone microenvironment. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11(6).
14. Kang X, Patel D, Ng S, Melchior M, Ludwig D, Hicklin D. High affinity Fc receptor binding and potent induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in vitro by anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007; 25(18).
15. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359(11): 1116-1127.
16. Schaudig K, Wang X, Bouchard C, Hirschberg AL, Cano A, et al. Efficacy and safety of Fezolinetant for moderate-severe vasomotor symptoms associated with menopause in individuals unsuitable for hormone therapy: phase 3b randomised controlled trial. *BMJ.* 2024; 387.
17. Chaudhary PK, Kim S. An insight into GPCR and G-proteins as cancer drivers. *Cells.* 2021; 10(12), 3288.
18. Li Q, Tie Y, Alu A, Ma X, Shi H. Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies. *Sig Transduct Target Ther.* 2023; 8(1): 31.
19. Bhogal N, Donnelly D, Findlay JB. The ligand binding site of the neurokinin 2 receptor. Site-directed mutagenesis and identification of neurokinin A binding residues in the human neurokinin 2 receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269(44): 27269-27274.
20. Sun W, Yang F, Zhang H, Yuan Q, Ling S, et al. Structural insights into neurokinin 3 receptor activation by endogenous and analogue peptide agonists. *Cell Discov.* 2023; 9(1): 66.
21. Arun I, Maity N, Hameed S, Jain PV, Manikantan K, Sharan R, Arun P. Lymph node characteristics and their prognostic significance in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2021; 43(2): 520-33.
22. Hussain SFJ, Fareed M, Karobari MI. miRNA regulation of the Akt/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma: a focused review. *Discov Oncol.* 2025; 16(1): 1355.
23. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer.* 2023; 22(1), 138.

脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

口腔顎顔面外科学分野

(指導：伊原木聡一郎教授)

図と表の説明

図1 中枢神経系における NKB-NK-3R 系の模式図。視床下部には KNDy (kisspeptin, neurokinin B, dynorphin) ニューロンが存在し、その細胞膜上に NK-3R が発現している。KNDy ニューロンから放出された NKB が、オートクライン的に NK-3R に作用して KNDy ニューロンを活性化し、視索前野にあるゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)ニューロンを刺激する。一方 DYN は KNDy ニューロンの活動を抑制する。NKB および DYN による刺激と抑制のバランスにより、GnRH ニューロンは下垂体から性腺刺激ホルモンをパルス状に分泌し、卵巣や精巣の機能を制御している。Fezolinetant は NKB の NK-3R への結合を阻害することで、KNDy ニューロンの活性化を抑制する。DYN：ダイノルフィン、FSH：卵胞刺激ホルモン、LH：黄体形成ホルモン、NKB：ニューロキニン B、NK-3R：ニューロキニン 3 受容体

図2 NKB 刺激によるヒト OSCC 細胞株の増殖能、遊走能および浸潤能の解析

A) 増殖能、B) 遊走能、C) 浸潤能を示す。各ヒト OSCC 細胞株に NKB (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を添加し、各機能について解析を行った。測定方法および解析条件は材料ならびに方法に記載したとおりである。データは平均値 $\pm$ 標準偏差として示す。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$ 。

図3 Fezolinetant 添加における NKB 刺激ヒト OSCC 細胞株の増殖能、遊走能および浸潤能の解析

A) 増殖能、B) 遊走能、C) 浸潤能を示す。各ヒト OSCC 細胞株に NKB 0.1 μ M と Fezolinetant (0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M) を併用した条件下で、各機能について解析を行った。測定方法および解析条件は材料ならびに方法に記載したとおりである。データは平均値 $\pm$ 標準偏差として示す。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

図4 NKB および Fezolinetant 刺激後の PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の解析

A) HSC3-M3 細胞を NKB 0.1 μ M で刺激し、図に示す時間後に細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 解析を行った。B) HSC3-M3 細胞を NKB 0.1 μ M で 30 分間刺激後、Fezolinetant 1.0 μ M を添加し、図に示す時間後に細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 解析を行った。解析条件および使用した抗体は材料ならびに方法に記載したとおりである。

図5 OSCC 臨床検体における NK-3R の免疫組織化学染色像

(A) NK-3R 陽性症例、(B) NK-3R 陰性症例を示す。腫瘍切除標本に対して免疫組織化学染色を行い、NK-3R の発現を評価した。スケールバー=100 μ m。

表1 Western blot 解析に使用した抗体一覧

本研究で Western blot 解析に使用した一次抗体、二次抗体について抗体名、カタログ番号、メーカーおよび希釈倍率を示す。

表2 NK-3R 発現と臨床病理学的因子の比較

NK-3R 陽性群および陰性群における臨床病理学的因子を示す。評価項目には性別、年齢、発生分類、腫瘍サイズ、T 分類、N 分類、Stage 分類、頸部リンパ節外浸潤 (ENE) および 1 年生存率を含む。

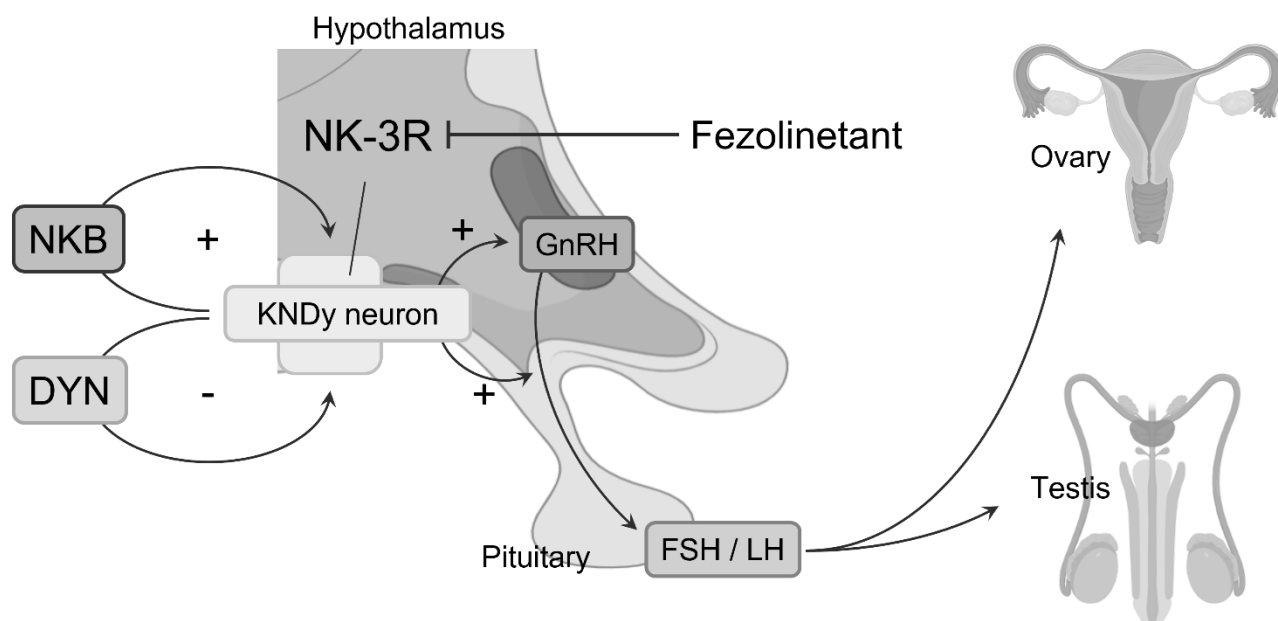


Figure 2A

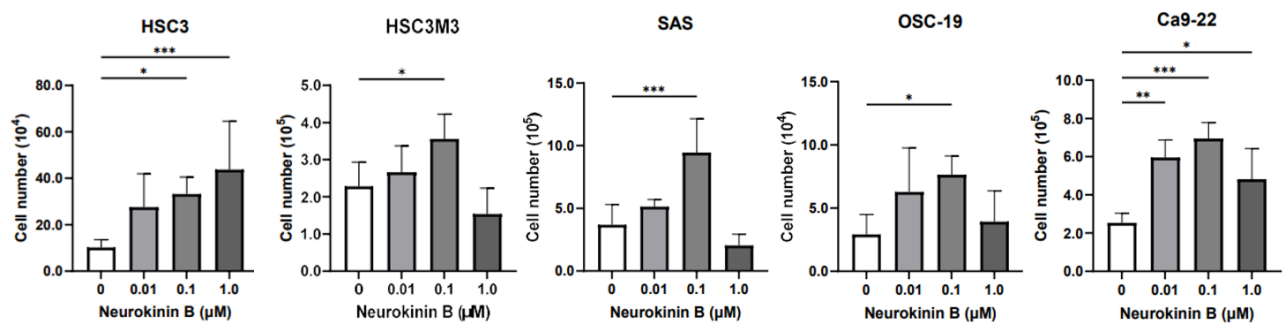


Figure 2B

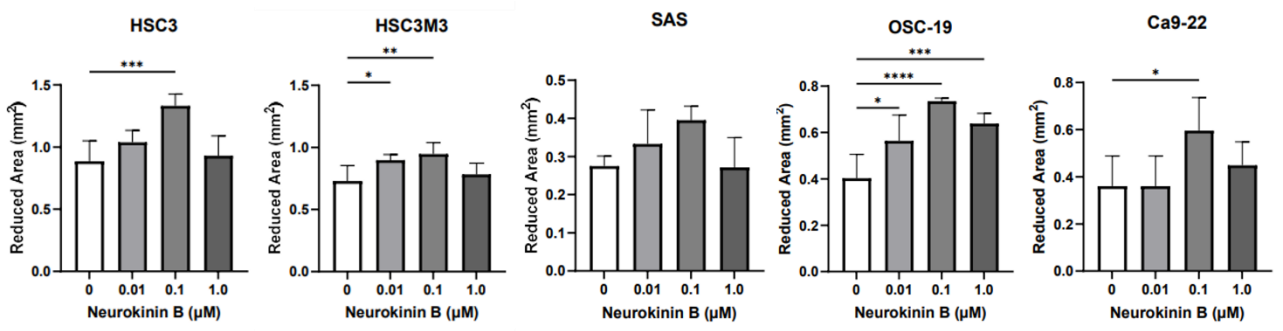
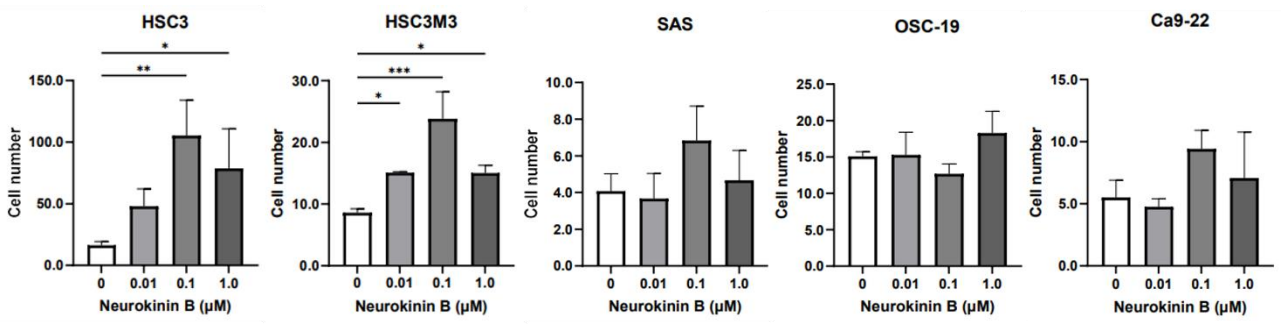
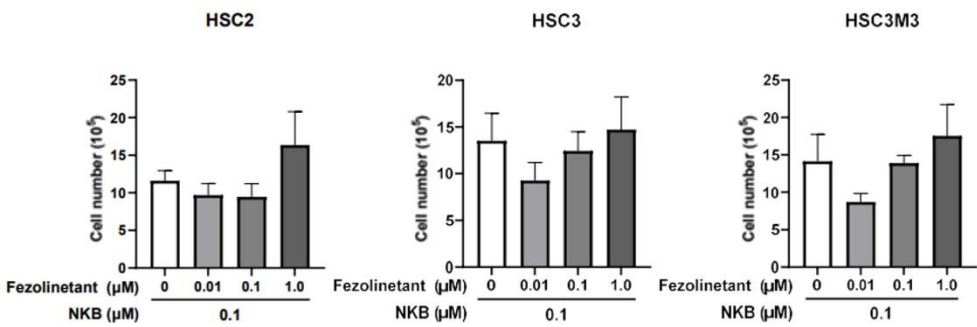


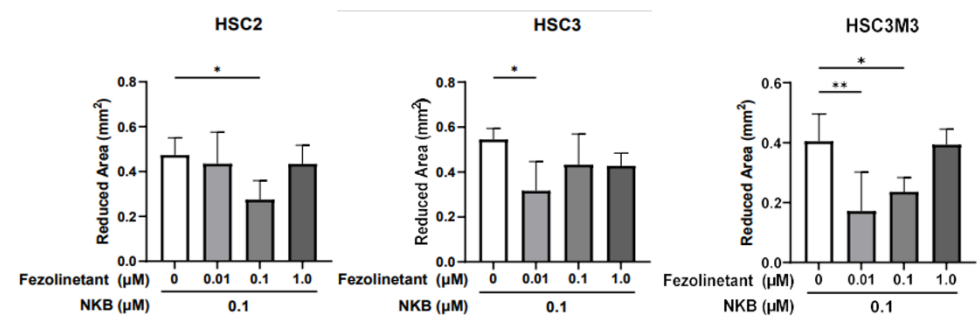
Figure 2C



☒ 3A



☒ 3B



☒ 3C

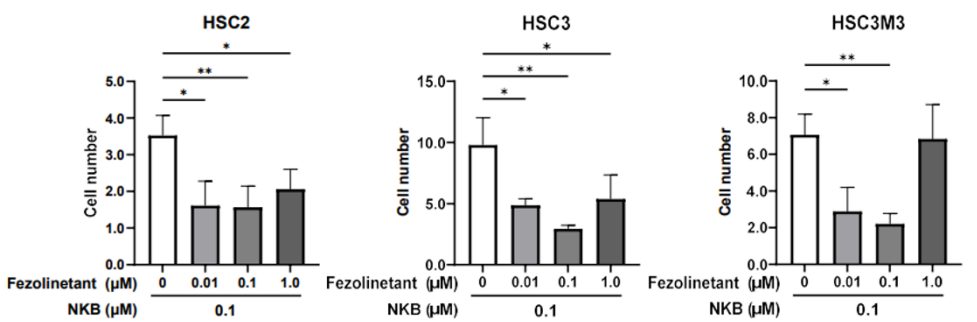


图 4A

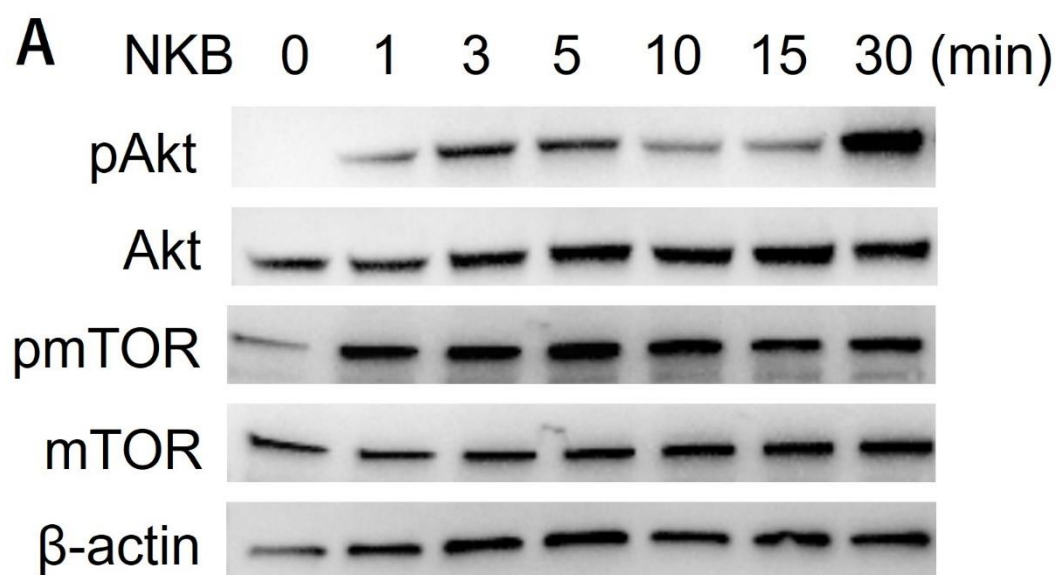


图 4B

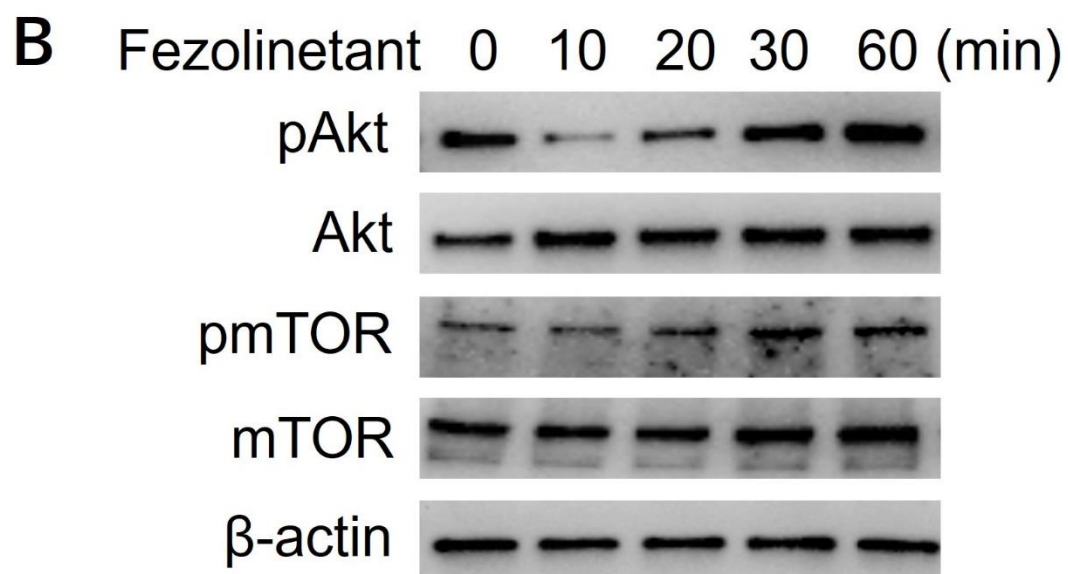


图 5A



图 5B

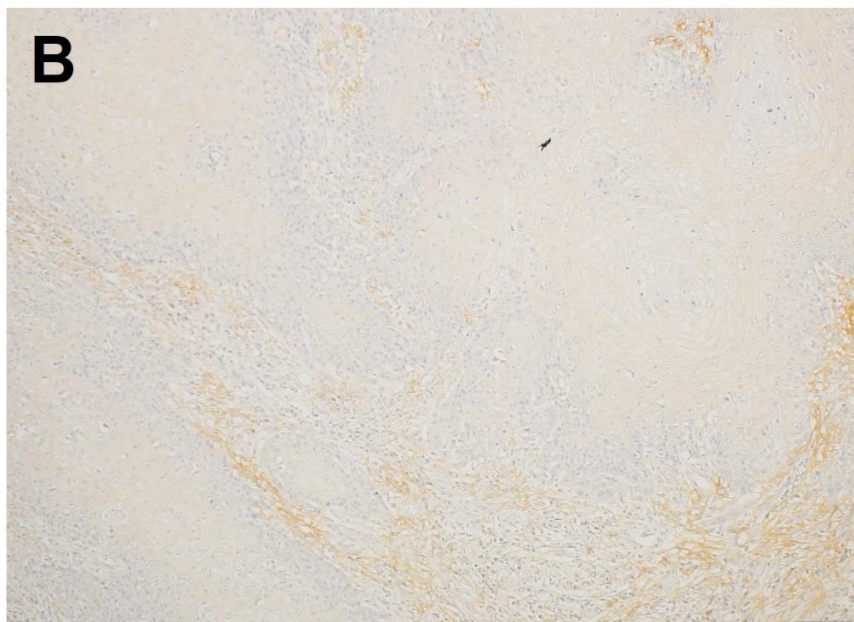


表 1

Antibody Name	Purpose	Catalog Number	Supplier	Dilution
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	Primary antibody	#4060	Cell Signaling Technology	1:2000
Akt (pan) (40D4) Mouse mAb	Primary antibody	#2920	Cell Signaling Technology	1:2000
Phospho-mTOR (Ser2481) Antibody	Primary antibody	#2974	Cell Signaling Technology	1:1000
mTOR Antibody	Primary antibody	#2972	Cell Signaling Technology	1:1000
β-Actin (13E5) Rabbit mAb (HRP Conjugate)	Primary antibody	#5125	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Secondary antibody	#7074	Cell Signaling Technology	1:2000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Secondary antibody	#7076	Cell Signaling Technology	1:2000
Anti-Neurokinin B receptor Antibody	Secondary antibody	bs-0166R	Bioss Inc.	1:500
ImmPRESS HRP Universal Antibody (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG) Polymer Detection Kit, Peroxidase	Secondary antibody	MP-7500	Vector Laboratories, Inc.	1:1

表 2

	All	Positive of NK-3R group	Negative of NK-3R group	P value
N	66	23	43	
Age, years				
Median (IQR)	77 (72.75-83)	76 (74-84)	77 (72-82.5)	0.88
Gender (%)				
Male	35 (53.0)	8 (34.8)	27 (62.8)	0.04*
Female	31 (47.0)	15 (65.2)	16 (37.2)	
Primary tumor site (%)				
Buccal mucosa	16 (24.2)	7 (30.4)	9 (20.9)	0.11
Maxillary gingiva	14 (21.2)	4 (17.4)	10 (23.3)	
Mandibular gingiva	18 (27.3)	5 (21.7)	13 (30.2)	
Mouth floor	9 (13.6)	1 (4.3)	8 (18.6)	
Tongue	7 (10.6)	4 (17.4)	3 (7.0)	
Plate	2 (3.0)	2 (8.7)	0 (0.0)	
T classification (%)				
T1	18 (27.3)	2 (8.7)	16 (37.2)	0.09
T2	24 (36.4)	11 (47.8)	13 (30.2)	
T3	4 (6.1)	2 (8.7)	2 (4.7)	
T4a	18 (27.3)	7 (30.4)	11 (25.6)	
T4b	2 (3.0)	1 (4.3)	1 (2.3)	
Tumor size (mm)				
Median (IQR)	28 (20-33)	29 (23.5-34.0)	23.5 (15.8-30.5)	0.03*
N classification (%)				
N0	50 (75.8)	14 (60.9)	36 (83.7)	0.02*
N1	3 (4.5)	1 (4.3)	2 (4.7)	
N2b	6 (9.1)	2 (8.7)	4 (9.3)	
N3b	7 (10.6)	6 (26.1)	1 (2.3)	
M classification (%)				
M0	66 (100.0)	23 (100.0)	43 (100.0)	>0.99
M1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Stage (%)				
I	16 (24.2)	1 (4.3)	15 (34.9)	<0.01**
II	20 (30.3)	8 (34.8)	12 (27.9)	
III	6 (9.1)	3 (13.0)	3 (7.0)	
IVA	16 (24.2)	5 (21.7)	11 (25.6)	
IVB	8 (12.1)	6 (26.1)	2 (4.7)	
Presence of ENE (%)				
Positive	7 (17.5)	6 (35.3)	1 (4.3)	0.03*
Negative	33 (82.5)	11 (64.7)	22 (95.7)	
Primary tumor differentiation (%)				
High	4 (8.0)	0 (0.0)	4 (13.3)	0.30
Medium	12 (24.0)	5 (25.0)	7 (23.3)	
Low	34 (68.0)	15 (75.0)	19 (63.3)	
1-year outcome (%)				
Live	58 (87.9)	17 (73.9)	41 (95.3)	0.02*
Death	8 (12.1)	6 (26.1)	2 (4.7)	