

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20529

研究課題名(和文) 口腔癌のEMT強度制御マーカーの同定

研究課題名(英文) Effectors of EMT intensity in oral cancer

研究代表者

石田 扶美(田中扶美)(Fumi, Ishida)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：60625979

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)：舌癌細胞株OM-1のEMT誘導モデルを用いてEMT制御因子を幹性・分化の視点から総合的に解析すると、EMTと幹性は密接な関係があるにもかかわらず、すべてのEMT形質に幹性が伴わないこと、その幹性には組織幹細胞レベルが重要であること、そしてEMTは一定の分化系統を示すわけではなく、その分化の転換先は周囲環境によって可変であることが示唆され、我々が想定したものより複雑であることがわかった。今後、多くの分化マーカーでEMT強度との相関性を追求するスクリーニングアプローチではEMT強度制御因子の同定は困難であることが示唆され、異なるアプローチを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の治療予後は再発・転移によって決定するため、癌患者の生存率を上げることに直結する研究は癌の再発と転移を抑制することにある。この問題の本質は癌幹細胞仮説とEMTと考えられており、我々は長年のEMT研究の実績からEMT制御のメカニズムを解明することが最重要と考えている。本研究ではそのメカニズムのキーとなるEMT制御因子の同定を目指した。この機構は非常に複雑であるが、幹性と分化の視点から数多くの分子の発現検索や、発現細胞の分布を調べることによって、その一端を本研究で明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analysis of EMT regulatory factors from the perspective of stemness and differentiation using the EMT induction model of the tongue cancer cell line OM-1 shows that all EMT traits are in spite of the close relationship between EMT and stemness, suggesting that the tissue stem cell level is important for stemness, and that EMT does not show a constant lineage, and the conversion destination of differentiation is variable depending on the surrounding environment was found to be more complicated than we assumed. From now on, it is suggested that the identification of the EMT intensity regulatory factor is difficult by the screening approach that pursues the correlation with the EMT intensity with many differentiation markers, and we will consider that different approaches are needed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 EMT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、癌の進展過程において癌細胞に生じる分化転換の重要性は広く認知されており、局所浸潤では上皮間葉転換 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) が深く関与している。2000年に癌の悪性化と EMT に関する論文が報告されて以来 (Nat Cell Biol 2:76-83, 84-9, 2000)、EMT に関する研究は現在の癌研究を席卷している。特に、古くは癌遺伝子、最近では癌幹細胞の提唱者である Robert Weinberg 博士らのグループは癌の進展における EMT 関与について多数報告している。

申請者が所属する研究室の口腔癌研究グループが蓄積したデータとその分析から、口腔癌の浸潤先端部位で生じる EMT 型癌細胞の出現を *in vitro* で実験的に再現し、EMT 型癌細胞、非 EMT 型癌細胞および癌周囲環境の相互関係を体系化した口腔癌の局所浸潤モデルを作製した。

これらの結論から、EMT、そして EMT 型癌細胞が取り巻く口腔癌の局所浸潤機構の分子生物学的フレームワークを明確にした。今後、「個々の癌細胞における EMT 強度の調節機構」および「癌組織における EMT 型癌細胞のポピュレーション形成機構」を明らかにする計画を立て、内的および外的 EMT 誘導・強度調節機構と、癌組織における EMT 型癌細胞の存在規制と意義の、全てのバランスを見だし、同時に、EMT 誘導阻止に繋がるデータ取得を試みる。

EMT は「E-カドヘリンの発現消失」と「ビメンチンの高発現」の結果、「線維芽細胞様形態」と「(単細胞性)細胞運動能獲得」と定義される。しかし、癌細胞において EMT プログラムが完了することよりも、むしろ partial EMT と呼ばれる不完全な EMT 形質を示す柔軟性を持っている。この柔軟性が癌周囲環境への適応に重要であると考えられる。例えば、癌組織の一部の癌細胞集団の RNA を抽出し、E-カドヘリンとビメンチンの発現変化を検出して、「EMT が生じているのでこの癌は浸潤能や悪性度が高い」と一概に判定できない。多くの口腔癌症例のほとんどの癌細胞は非 EMT 型であり、さらには転移巣の癌細胞は MET を起こして上皮形質を取り戻すと考えられているからである。癌細胞が浸潤を経て脈管内移動するまでは EMT 表現型の方が有利であるが、「EMT プログラムを完了すること」が目的ではなく、さらに EMT 形質をずっと維持する必要もないし、癌組織のすべての癌細胞が EMT 型である必要もない。つまり、癌細胞に生じる分化転換の本質は、その潜在能の利用である。

一方で、癌幹細胞仮説では、ごくわずかの癌幹細胞がその他の癌細胞の運命を握り、癌を組織として制御していると考えられている。多くの研究室が癌幹細胞様細胞を分離し、それら細胞が EMT 形質を示しており、幹性と EMT との関連性が注目されている。申請者らの研究グループは、ウイルスベクターで EMT 誘導因子 Snail を導入した癌細胞プールを作製し、可逆的な EMT 誘導系を再現した (J Cell Biochem 2013)。この細胞プールを TGF $\beta$  などのサイトカインで刺激すると、ほぼ全ての癌細胞が「細胞膜 E-カドヘリンの消失」と「ビメンチンの中間径線維化」を示す完全な EMT 表現型を示すようになる。この結果は、あらゆる癌細胞に EMT が生じる可能性を示し、以前より論議されていた定説と一致する (EMT Research Surges, J Natl Cancer Inst, 2008)。

従って、「癌幹細胞 = EMT 型」ではないし、EMT 型癌細胞の中に癌幹細胞が潜んでいるとも言いきれない。とは言え、癌胞巣の間質と接するマージンにいる癌細胞が、炎症細胞などから放出するサイトカインに反応して偶然に EMT が生じて単独で浸潤するようになり、そして脈管内へ侵入するとは考えにくい。申請者らは、少数の EMT 型癌細胞が癌胞巣を形成する非 EMT 型癌細胞集団の浸潤をリードするモデルを提唱したが、局所浸潤の前線に張る EMT 型癌細胞が「癌組織のリーダー」であるかどうかは不明である。

## 2. 研究の目的

口腔癌の局所浸潤様式は癌組織単位で様々であり、山本・小浜分類ではびまん性浸潤に近くなるほど悪性が高く、予後不良となる傾向がある。この要因には癌細胞の EMT 強度が関わっているのは間違いない。癌周囲環境 (炎症など) からの外的因子 (サイトカインなど) を想定した癌細胞の EMT 強度の制御機構について明らかにしてきたが、癌組織中の EMT 型癌細胞の比率と EMT 強度の決定要因については不明である。

これら不明な点を明らかにする目的で、本研究では、癌組織を構成する癌細胞間で EMT 強度を制御する機構を解析する。

そして、「E-カドヘリン」と「ビメンチン」の発現変化で EMT の判定をすると、ほぼすべての癌細胞が Snail の強制発現とサイトカイン刺激によって EMT 表現型を示す。当口腔癌研究グループの重石英生が英国留学先の研究室で、癌細胞株を CD44 と ESA (Epithelial Specific Antigen) でソートして Snail の高発現を伴う EMT 表現型を示す癌幹細胞様細胞を分離した (Stem cells 2013)。そこで、Snail 強制発現癌細胞プールを CD44 と ESA でソートしたところ、EMT 表現型と幹性を両方有する一定量の癌細胞群を分離できた。しかし、重要なのは、その他の癌細胞 (ESA 高発現) もサイトカイン刺激によって EMT が誘導される事実である。つまり、EMT 型と定義される癌細胞の中には、ESA が発現していて上皮細胞としてのアイデンティティを保持しているものが多く存在する。癌細胞は EMT を起こしても完全に間葉細胞になるわけではなく、EMT に潜在する能力を選択的に利用している可能性がある。

癌の進展のリーダーとなる癌細胞が、幹性を有する癌細胞群の中に存在するか、或いは上皮形質を保持する癌細胞群の中か、それとも癌細胞のリーダーは存在しないかは現時点ではわからない。

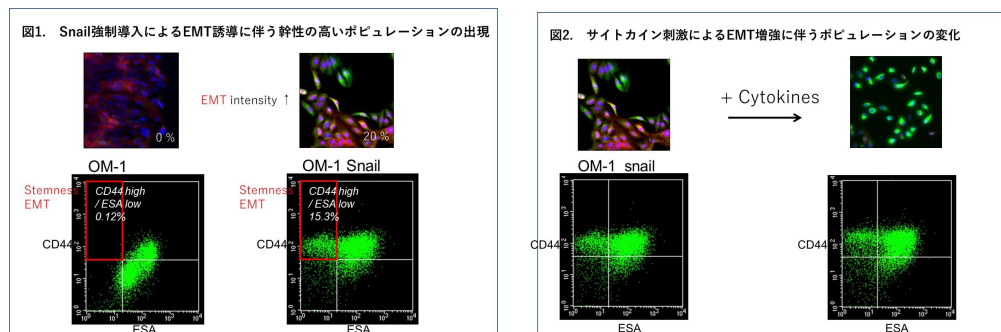
本研究では、癌細胞間相互作用としての EMT 強度制御機構を見出すための糸口として、幹性を有する癌細胞群と、EMT 型かつ上皮形質を残す細胞群とを分離する新たなマーカーを抽出する。

### 3. 研究の方法

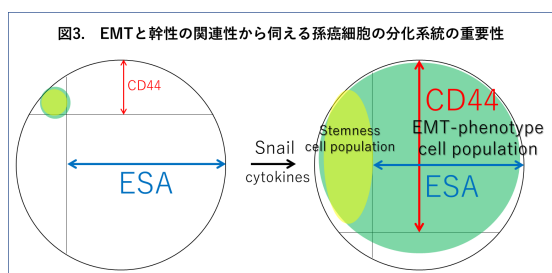
舌癌由来細胞株 OM-1 を親株とし、ウイルスベクターにて Snail、あるいは Slug を導入した娘細胞株を樹立し、段階的な EMT 誘導モデルとして既に確立した細胞株を使用した。各細胞株の E-カドヘリン、ビメンチンのタンパク発現を蛍光免疫細胞染色法で確認し、EMT 強度を測定した。また、Snail、Slug、ESA および分化・未分化マーカーの mRNA 発現を semi-quantitative RT-PCR 法で、タンパク発現は Western blotting 法で確認した。EMT における癌細胞のポピュレーションはフローサイトメトリーで解析した。

### 4. 研究成果

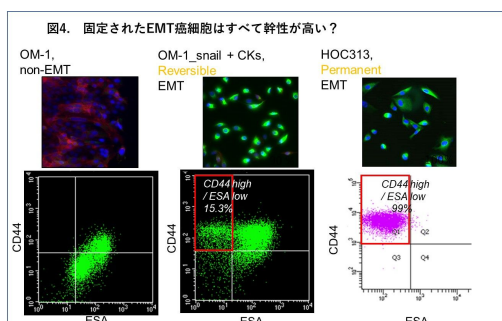
図 1 のように、フローサイトメトリーで OM-1 を幹細胞マーカー CD44 と扁平上皮細胞分化マーカーでソートすると、癌幹細胞様の幹性の高い癌細胞は CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> に分画され、全体の約 0.12% となった。OM-1 に転写因子 Snail をウイルスベクターで強制導入すると、条件依存的に EMT が誘導される。この OM-1\_Snail では CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は約 15.3% と増殖した。さらにこの OM-1\_Snail はサイトカイン刺激でほぼすべての癌細胞が EMT 表現型を示すようになるが、フローサイトメトリーによる CD44 と ESA の分画に変化はなかった (図 2)。



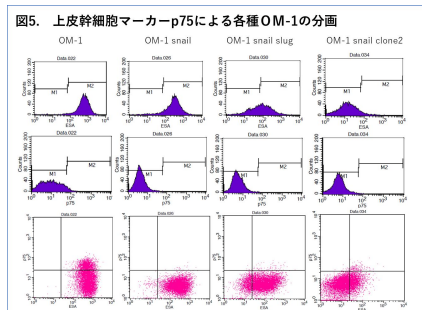
これらの結果を図 3 で図解すると、OM-1 に存在する癌幹細胞様の幹性の高い癌細胞は、Snail 誘導性 EMT によってそのポピュレーションは増大する。しかし、すべての癌細胞で生じる EMT の中の一部に過ぎなく、幹性の高い癌細胞すべてが EMT 表現型を示すわけではないことが明らかとなった。



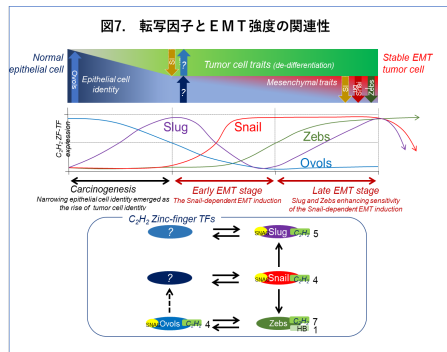
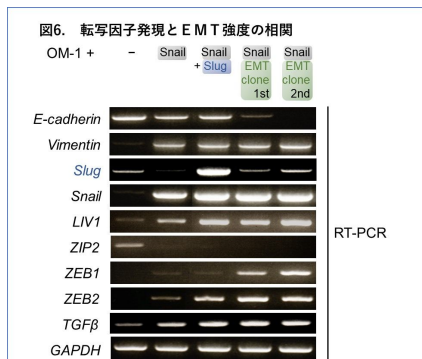
一方で、口腔底癌細胞株 HOC313 は、すべての癌細胞においてパーマネントな EMT 表現型を示し、その表現型は非可逆的で固定されたている (図 4)。これら癌細胞の約 99% が CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> であった (図 4)。この結果は図 2 とは異なり、すべての EMT 表現型細胞の幹性は高いと想定され、EMT と幹性の関連性の複雑性が判明した。



これらの結果から、EMT の強度の意義を考える上で、分化と幹性との関連性を考慮する必然性が考えられた。しかし、CD44 を指標とした癌幹細胞様特性を追求するのではなく、さらにサイトカインによる EMT 強度のブーストは幹性に直接関与しない可能性が考えられたため、外的因子を除いた幹性・分化マーカーを検索することとした。



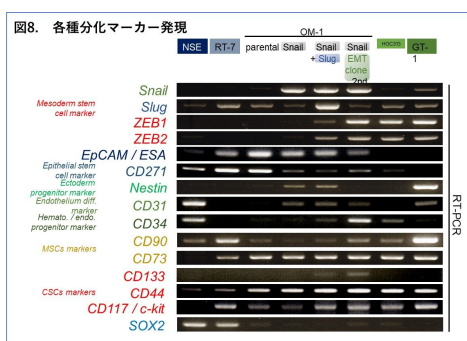
p75 は扁平上皮幹細胞マーカーとして知られており、OM-1 においても p75 によって癌組織の分化系統形成能は維持されていると考えられる。Snail および Slug による EMT 強度増強により、p75 陽性細胞は著しく減少するが、一定数の p75 陽性細胞は存在した ( 図 5 )。さらに p75 陽性細胞数と EMT 強度とは比例しなかった ( 図 5 )。



Snail 他各種 EMT 誘導性転写因子とされるマーカーの発現を RT-PCR で測定した ( 図 6 )。これら結果から、図 7 のようにいくつかの転写因子が EMT 強度を制御していることが確認できた。しかし重要なのは、これら EMT マスター転写因子の発現挙動だけでなく、これらが制御する分化コントローラー分子の解析である。

そこで図 8 に、数十ものマーカーで、NSE ( 正常扁平上皮組織 ) から不死化線維芽細胞株 GT-1 に至るまでの mRNA 発現の検索の一部を示す。これら結果から、EMT は一定の組織分化系統を示すものではないことが判明し、間葉細胞様へ形質転換が EMT であるが、転換先の分化系統は不均一であることが分かった。

以上の結果を総合的に解析すると、EMT と幹性は密接な関係があるにもかかわらず、すべての EMT 形質に幹性が伴わないこと、その幹性には組織幹細胞レベルが重要であること、そして EMT は一定の分化系統を示すわけではなく、その分化の転換先は周囲環境によって可変であることが示唆され、我々が想定したものより複雑であることがわかった。今後、多くの分化マーカーで EMT 強度との相関性を追求するスクリーニングアプローチでは EMT 強度制御因子の同定は困難であることが示唆され、異なるアプローチを検討する予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

1. 舌癌由来細胞株 OM-1 における分化転換能の解析：植月 亮，東川晃一郎，重石英生，石田扶美，小野重弘，島末 洋，武知正晃.：第 63 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2018.11.2 幕張)
2. Semi-stable EMT 型口腔癌細胞における上皮幹細胞特性の解析：植月 亮，東川晃一郎，重石英生，石田扶美，小野重弘，島末 洋，武知正晃.：第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2017.10.21 京都)
3. 亜鉛トランスポータースイッチが口腔癌細胞の EMT 誘導機構を制御する：植月 亮，東川晃一郎，奥井 岳，石田扶美，山本一博，重石英生，小野重弘，武知正晃.：第 70 回日本口腔科学会学術集会(2016.4.15 福岡)
4. Snail-induced EMT ignores epithelial stem cell-like properties of oral squamous cell carcinoma cells: Uetsuki R, Higashikawa K, Shigeishi H, Ishida F, Ono S, Shimasue H, Ohta K, Takechi M.：第 49 回広島大学歯学会総会(2016.7.2 広島)
5. 口腔扁平上皮癌細胞における幹性と EMT との関連性についての in vitro 解析:植月 亮，東川晃一郎，重石英生，石田扶美，小野重弘，島末 洋，武知正晃.：第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2016.11.25 幕張)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：東川晃一郎

ローマ字氏名：Higashikawa Koichiro

研究協力者氏名：植月 亮

ローマ字氏名：Uetsuki Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。