

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11398

研究課題名(和文) 頭頸部がん微小環境におけるがん幹細胞のEMTを介した浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the EMT-mediated invasion and metastasis mechanisms of cancer stem cells in the head and neck cancer microenvironment

研究代表者

太田 一郎 (OTA, ICHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00326323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞を取りまく微小環境の重要性が注目されており、がんの浸潤・転移のしやすさががん細胞自体のみならず、がん細胞と微小環境との相互関係と深く関与していることが分かりつつある。これまでにWntシグナル伝達経路がSnailを介してEMTを誘導することで、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出してきた。今回、EMTががんの浸潤・転移のKey Factorであるとともに、がん幹細胞の重要な制御因子であることが示唆された。さらに頭頸部がん細胞における微小環境下のがん幹細胞の同定とその活性化の解析の結果、がん微小環境下ではEMTが亢進しており、癌の浸潤能も増強されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナル伝達経路がSnailを介してEMTを誘導することで、MT1-MMPおよびMT2-MMPを活性化させるとともに、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを示した。さらに、頭頸部がん細胞においていかにしてがん微小環境がEMTを誘導し、がん幹細胞を活性化させ浸潤・転移を促しているかを、in vitroおよびin vivoのレベルで分子生物学的手法および独自の浸潤・転移モデルを用いて解明の糸口を見出した。今後、その経路の分子標的薬の開発により、一層の治療効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The importance of the microenvironment surrounding cancer cells has received much attention. The susceptibility of cancer to invasion and metastasis is closely related not only to the cancer cells themselves, but also to the interactions between cancer cells and their microenvironment. We have found that the Wnt signaling pathway induces EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) through Snail to acquire the invasion and metastatic potential of cancer cells. This current study suggested that EMT is a key factor in cancer invasion and metastasis as well as an important regulator of cancer stem cells. Furthermore, identification of cancer stem cells in the microenvironment and analysis of their activation in head and neck cancer cells suggested that EMT was enhanced in the cancer microenvironment and the cancer invasiveness was also enhanced.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：がん幹細胞 微小環境 浸潤・転移 EMT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 頭頸部がんにおいて、これまでの治療の進展により臓器温存を含めて患者の QOL は改善しつつあるものの、生存率の大きな改善に至っていないのが現状である。その死因の多くは局所再発と遠隔転移であり、つまり、いかにがんの浸潤・転移を制御するかが治療の要であると考えられる。
- (2) がんが浸潤・転移していく過程で、上皮の基底膜や周囲の間質を突き破り増殖していくためにはタンパク質分解酵素が必要であり、特にその浸潤・転移のあらゆる局面において Matrix metalloproteinase (MMP) が関与していると言われている (Matrisian LM, *et al.* J Clin Oncol, 2000)。我々は、これまでにとりわけ細胞膜結合型の MMP である MT1-MMP が、がん細胞自身に強発現し、がん細胞の浸潤・転移の直接的な担い手になっていることを報告してきた (Sabeh F, *Ota I*, *et al.* J Cell Biol, 2004)。さらに、Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮間葉移行) を誘導することで、MT1-MMP 及び MT2-MMP を誘導し、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出ししてきた (*Ota I*, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2009; Yook JI, *Ota I*, *et al.* Nat Cell Biol, 2006; Yook JI, *Ota I*, *et al.* J Biol Chem, 2005)。さらに、EMT は、がんの浸潤・転移の Key Factor であるとともに、がん幹細胞の重要な制御因子であることが示唆された。
- (3) 一方、「がん」はがん細胞と炎症細胞、血管・リンパ管、線維芽細胞、細胞外基質などの間質組織より作られている。がんの浸潤・転移を代表とする「がん」の特性は、がん細胞自身とその周囲組織から作られる微小環境との相互関係 (ネットワーク) が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。(図 1, Hanahan D and Weinberg RA, Cell, 2011)。したがって、このようながん微小環境の形成機構を明らかにすることは、新しいがん診断法や治療法開発のためにも重要な課題と考えられる。



図 1 がんの特性と微小環境ネットワーク

2. 研究の目的

本研究では頭頸部がんの治療効果の向上のため、がん細胞の浸潤・転移のしくみを解明し、そのしくみを基に浸潤・転移を阻止することを目的としている。近年、がん細胞を取りまく微小環境の重要性が注目されており、がんの浸潤・転移のしやすさががん細胞自体のみならず、がん細胞と微小環境との相互関係が深く関与していることが分かりつつある。そこで、我々が開発したがんの浸潤・転移モデル実験系などを用いて、がん微小環境において、どのようにしてがん細胞が EMT を誘導するとともにがん幹細胞の活性化を促進し、がんの浸潤・転移を亢進させるかを解明する。

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部がん細胞における微小環境下の Wnt、Snail、MT1-MMP の発現とがん幹細胞の同定とその活性化の解析、および siRNA などの阻害薬および放射線を用いた浸潤の抑制効果の検討
- A) 生化学的な機能解析
頭頸部扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-1、HSC3、HSC4、SAS など) を用いて、微小環境下での Wnt、Snail、E-Cadherin、MT1-MMP などの発現および相互作用を RT-PCR、ウェスタン・ブロット、免疫沈降法、レポーターアッセイなどを用いて検討する。また、siRNA によるヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の発現抑制はコントロールを含め、electroporation 法 (Amaxa Biosystems) で細胞内に導入する。その導入効率は蛍光の nucleotide で 90% 以上あることを確認している。また siRNA の抑制効果は導入後 20 時間から 72 時間まで維持できることも確認している (Sabeh F, *Ota I*, *et al.* J Cell Biol. 167:769-781, 2004)。
- B) 癌幹細胞の同定
上記遺伝子導入細胞において、CD44、ALDH などの癌化細胞マーカーの同定、SP 細胞の同定、スフェロイド形成を確認することで癌幹細胞分画を同定する。
- C) 細胞浸潤実験 collagen invasion assay
rat tail tendon より抽出した type I collagen を 24-mm Transwell dish (3- μ m pore size; Corning, Inc) の upper chamber に 1 ml 加え (最終濃度 2.2 mg/ml)、ゲル化後、その上に上記で作製した遺伝子導入がん細胞 ($1.5-2 \times 10^5$ 個) を培地とともに加え、lower chamber には同様の培地とともにケモアトラクタントとして HGF (50 ng/ml) を加え、7 日間培養する。その間、隔日に培地を交換し、倒立顕微鏡でその浸潤度を解析する。最終的には collagen gel の cross section を作製し、浸潤度を評価する。

- (2) がん浸潤・転移モデルを用いた頭頸部がん移植腫瘍における微小環境での Wnt/Snail シグナル伝達経路によるがん幹細胞の同定とその活性化の解析
我々が開発・確立した鶏卵による *in vivo* 癌浸潤・転移モデル(CAM assay) を用いて、糖尿病関連遺伝子、Wnt1 あるいは Snail を強発現させた癌細胞が、活性化癌幹細胞として生体において浸潤・転移能、さらには腫瘍増殖能を獲得するかどうかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 頭頸部癌細胞における微小環境下での EMT の誘導と浸潤能の亢進、およびレスベラトロールによる *REGIII* を介した癌増殖・浸潤能の抑制効果 (*in vitro*)
頭頸部癌細胞における低酸素状態の微小環境下での Wnt、Snail、MT1-MMP の発現、それに伴う EMT の解析に引き続き、癌幹細胞マーカーの同定、スフェロイド軽装の確認などをすることで癌幹細胞の誘導の検討を行った。一部の癌細胞において微小環境下において、Wnt-Snail のシグナル経路の活性化が認められ、EMT が誘導された。また、微小環境状態で運動能を解析したところ、コントロールの状態よりも細胞運動能が亢進していた。これらの結果より、*in vitro* において微小環境状態は Wnt-Snail シグナル経路を介して EMT を誘導し、癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。さらに、その抑制実験としてレスベラトロール付加によって *REGIII* 遺伝子を誘導させた結果、これらの癌細胞の増殖能・浸潤能を抑制することができた。
- (2) 頭頸部癌細胞における微小環境下での EMT の誘導と浸潤能の亢進およびレスベラトロールによる *REGIII* を介した癌増殖・浸潤能の抑制効果 (*in vivo*)
これまでの *in vitro* 実験結果を踏まえて、鶏卵による *in vivo* 癌浸潤・転移モデルを用いての動物実験を施行した。*in vivo* において微小環境状態は Wnt-Snail シグナル経路を介して EMT を誘導し、癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。また、*in vitro* と同様に、*in vivo* においてもレスベラトロール付加によって *REGIII* 遺伝子を誘導させた結果、癌の増殖、および浸潤・転移を抑制することが示唆された。

以上の結果から、頭頸部癌細胞において微小環境下では Wnt-Snail のシグナル経路が活性化し、EMT が誘導され癌の浸潤転移能が亢進すると共に癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。さらに、レスベラトロール付加によって *REGIII* 遺伝子を介した癌の増殖、および浸潤・転移を抑制できることが示唆された。したがって、EMT に関わるこれらのシグナル伝達経路を制御することは頭頸部癌の浸潤・転移を制御することに繋がると考えられ、本研究が今後の癌浸潤・転移抑制薬の創薬への試金石となり得ることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mikami S, Ota I, Masui T, Uchiyama T, Okamoto H, Kimura T, Takasawa S, Kitahara T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Resveratrol induced REG III Expression Enhances Chemo and Radiosensitivity in Head and Neck Cancer in Xenograft Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Rep .	6. 最初と最後の頁 436-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7137.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ichiro Ota, Takashi Masui, et al.
2. 発表標題 Snail-induced EMT promotes the properties of cancer stem cells in head and neck cancer cells in vitro and in vivo
3. 学会等名 IFHNOS 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ota I, Kimura T, Masui T, Yook JI, Mikami S, Uemura H, Kitahara T
2. 発表標題 The mechanism of cancer invasion and metastasis through EMT signaling in head and neck cancer
3. 学会等名 5th Congress of ASHNO（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 昭久 (Takahashi Akihisa) (60275336)	群馬大学・重粒子線医学推進機構・教授 (12301)	