

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11874

研究課題名(和文)新規EMT関連遺伝子DUOX1が誘導する唾液腺癌の浸潤機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the invasive mechanism of salivary gland cancer induced by novel EMT-related gene DUOX1

研究代表者

小野 重弘 (Ono, Shigehiro)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：70379882

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)：癌の浸潤・転移機構の一つとしてEMTに着目して研究を継続している。そこでDUOX1が誘導すると考えられる口腔癌の高度浸潤能獲得におよぼすEMTの機構を明らかにすることを目的として本研究を遂行した。DUOX1ノックダウン細胞と過剰発現細胞を使って、EMTに関して解析を行い、さらに幹細胞特性について検討した。その結果、DUOX1はEMTを介して口腔扁平上皮癌の浸潤転移能獲得に関与している可能性が示唆され、また幹細胞様形質を持つことが示唆された。一方で腺様嚢胞癌に関しては、今後もさらなる検討を継続していく予定である。以上のことから、DUOX1を標的として癌の浸潤・転移の制御の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の浸潤・転移機構に関して詳細は十分に解明されていない。これまでにわれわれは一つの候補としてEMTを介した高度浸潤能獲得機構について研究を継続している。本研究の結果により、EMTを介した口腔癌の浸潤・転移獲得機構にDUOX1が関与している可能性が示唆された。本遺伝子が比較的予後の悪いとされる口腔癌の浸潤と転移を制御しうる口腔癌治療の標的遺伝子になりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：We pay our attention to EMT as essential one of the invasion, the metastasis mechanisms of the cancer and continue a study. There are extremely few reports that DUOX1 thought to be the new EMT-related gene is associated with invasion, metastasis of oral cancer. We examined the cell motility assay, the substrate splitting enzyme assay and the cell adhesion assay using DUOX1 knockdown cells and overexpression cells and examined analysis about EMT. Furthermore, we examined stem cells properties. As a result, the possibility that DUOX1 was involved in invasive metastaticity acquisition of oral squamous cell carcinoma via EMT was suggested, and it was suggested to have stem cells-like character. Whereas we have not examined about the adenoid cystic carcinoma satisfactory, however we are going to continue further examination in future about the adenoid cystic carcinoma. These results suggest that Duox1 could be the target gene to a control for Invasion and metastasis of oral cancers.

研究分野：外科系歯学

キーワード：上皮間葉移行 唾液腺癌 口腔癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは以前より、「臨床的に口腔癌の浸潤・転移を抑えることを目的とした基礎的研究」という口腔癌研究における基本理念の下で研究を行っており、その中でも口腔癌の浸潤・転移機構の本質の一つとして上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) に着目して研究を継続して行っている。一方、近年、EMT の生じた一部の細胞で癌幹細胞様形質があることが他臓器癌で報告されている。口腔癌、特に唾液腺癌では EMT と癌幹細胞との関連についての報告はほとんどない。われわれが臨床の現場で経験する予後不良の口腔癌はおおまかに 2 種類ある。口腔扁平上皮癌と唾液腺癌である。口腔扁平上皮癌は頭頸部領域で最も発生率の高い癌であり、リンパ行性および血行性に転移する。その転移率は 30-40% とされており、予後は極めて不良である。また、唾液腺癌の一つである腺様嚢胞癌は、神経や血管への著明な局所浸潤と、肺転移を代表とする血行性遠隔転移を特徴とする悪性度の高いことが特徴で、再発率は 16-85%、遠隔転移率は 25-55% とされ、転移症例の予後は極めて不良である。口腔癌、特に唾液腺癌において、DUOX1 が癌の浸潤、転移に関与しているという報告は極めて少なく、EMT に関与していることを報告している論文は国内外で極めて少ない。

### 2. 研究の目的

われわれは DUOX1 が関与していると考えられる唾液腺癌、口腔扁平上皮癌の高度浸潤能獲得におよぼす EMT の機構の詳細を明らかにすることを目的として本研究を遂行している。これまでにわれわれが EMT に関して研究し、解明してきた細胞運動能、基質分解酵素の発現上昇、細胞接着因子の発現低下等を DUOX1 ノックダウン細胞と過剰発現細胞を樹立し、これらを用いて詳細に細胞生物学的手法を用いて解析、検討を行い。さらに、幹細胞特性について検討を行う。以上のことを踏まえ、DUOX1 遺伝子が口腔癌細胞においていかに EMT や癌幹細胞様形質の獲得に関与するかを詳細に解明することを今回の研究の主目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) DUOX1 を介して唾液腺癌細胞株および口腔扁平上皮癌細胞株がどのように高度浸潤能を獲得するかを詳細に検討する。

DUOX1 ノックダウン細胞の樹立

DUOX1 遺伝子のシークエンスから複数の合成 siRNA を設計し、DUOX1 を発現している細胞に遺伝子導入する。ウエスタンブロッティング法で遺伝子産物の発現消失を確認し、最も効率のよい配列を決定する。これを siRNA 用発現ベクターに組み込み上記と同様に安定ノックダウン細胞を樹立する。

DUOX1 過剰発現細胞の樹立

申請者が見出した EMT 関連遺伝子 DUOX1 の発現細胞から DUOX1 mRNA を抽出し全長 cDNA を RT-PCR で増幅しシークエンスを確認後、発現ベクターに組み込む。これを DUOX1 の発現が消失している細胞にリポフェクチン法によって遺伝子導入する。G418 などの選択マーカーを培地に添加し、耐性細胞をクローニングリングによって分離し、それぞれの細胞における導入遺伝子産物の発現を、抗体を用いたウエスタンブロッティング法で確認する。DUOX1 ノックダウンおよび過剰発現細胞の細胞生物学的性状の検討

Wound healing assay を用いて遊走能、Matrigel invasion assay および再構成三次元培養を用いて浸潤能と浸潤様式の検討を行う。

4) DUOX1 ノックダウンおよび過剰発現細胞の腫瘍形成能解析

それぞれの培養細胞をヌードマウス背部皮下および舌におのおの 100 万個程度移植して、腫瘍形成能を解析する。

(2) DUOX1 をノックダウンあるいは遺伝子導入により EMT を獲得した細胞の一部が癌幹細胞様形質をもつことを解析するために、FACS による CD44 の発現解析、自己複製能を測るスフィアアッセイを行う。

DUOX1 ノックダウンおよび過剰発現細胞の腫瘍形成能解析

DUOX1 ノックダウン細胞から FACS 解析により得られた CD44 高発現細胞をヌードマウス背部皮下および舌におのおの 100 万個程度移植して、腫瘍形成能を解析する。

FACS 解析 (細胞分画)

腫瘍形成能を有することを確認したのち、DUOX1 ノックダウン細胞とコントロール細胞を FACS にて細胞表面マーカー (CD44, ALDH1) ごとに陽性、陰性に分画する。

スフィアアッセイ

非接着性プレートを用いて、血清無添加培地に上皮細胞成長因子 (EGF) および塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) のみを加えて、数週間培養してスフィアコロニーが形成されるかどうかを検討する。

(3) DUOX1 により誘導された EMT に関与する癌幹細胞を同定するために、さらに幹細胞マーカー SOX2, OCT4, Nanog mRNA の発現を確認する。

#### 癌幹細胞形質確認

DUOX1 ノックダウン細胞株における幹細胞マーカー-SOX2, OCT4, Nanog mRNA 発現を定量的 PCR 法にて確認する .

分画細胞の腫瘍形成能の解析

それぞれ分画した細胞株を背部皮下におのおの 100 万個程度移植して腫瘍形成能を解析する .

ヒト唾液腺癌における DUOX1 の発現解析

ヒト唾液腺癌組織における DUOX1 および間葉系マーカー-Vimentin 癌幹細胞マーカー-CD44 の発現を免疫染色により比較検討する .

#### 4 . 研究成果

癌の浸潤・転移機構の一つとして EMT に着目して研究を継続している . そこで DUOX1 が誘導すると考えられる口腔癌の高度浸潤能獲得におよぼす EMT の機構を明らかにすることを目的として本研究を遂行した . まず , 自研究室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株と唾液腺癌細胞株を用いて , 遺伝子導入あるいはノックダウン細胞を作成し研究を行った . 作成した DUOX1 ノックダウン細胞と過剰発現細胞を使って , まず , EMT に関して解析を行った . DUOX1 ノックダウン細胞において , EMT が獲得されることが示された . さらに幹細胞様形質獲得についても解析を行い , 同様の形質獲得がなされることが示された .

その結果 , DUOX1 のサイレンシングは EMT を介して口腔扁平上皮癌の浸潤転移能獲得に関与している可能性が示唆され , また幹細胞様形質を持つことが示唆された . 一方で唾液腺癌 ( 腺様嚢胞癌 ) に関しては , 今後もさらなる検討を継続していく予定である . 以上のことから , DUOX1 を標的として口腔癌の浸潤・転移の制御の可能性が考えられた .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Takechi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 High HPV16 E6 viral load in the oral cavity is associated with an increased number of bacteria: A preliminary study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep.	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2017.1025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M.	4. 巻 86
2. 論文標題 Candida albicans -Glucan-Containing Particles Increase HO-1 Expression in Oral Keratinocytes via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Immun.	6. 最初と最後の頁 e00575-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00575-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 舌癌由来細胞株OM-1における分化転換能の解析
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植月 亮, 東川晃一郎, 小野重弘, 武知正晃
2. 発表標題 Semi-stable EMT型口腔癌細胞における上皮幹細胞特性の解析
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植月 亮, 小野重弘, 武知正晃
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞における上皮幹細胞特性の解析
3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018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	武知 正晃 (Takechi Masaaki) (00304535)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授  (15401)	
研究分担者	飛梅 圭 (Tobiume Kei) (40350037)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授  (15401)	
研究分担者	東川 晃一郎 (Higashikawa Koichiro) (80363084)	広島大学・病院(歯)・講師  (15401)	