

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09550

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の非癌上皮細胞との衝突界面におけるアクチン重合配置の分子制御

研究課題名(英文) Molecular regulation of actin polymerization and arrangement in the lateral front between oral squamous cell carcinoma and non-cancerous epithelium

研究代表者

阿部 達也 (Abe, Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70634856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)の病理組織標本のタンパク質網羅的検索により、ladinin-1(LAD1)が非癌組織に接する癌組織で高発現することを報告した。しかし、LAD1の癌細胞における役割は不明であることから、その機能を検討することとした。OSCC培養細胞株を用いた発現抑制実験で、LAD1抑制細胞は増殖能低下、平面的細胞遊走能低下、三次元的細胞遊走能促進を示した。また、LAD1は細胞内でアクチンアークに局在し、LAD1発現抑制下でlamellaの伸展低下、上皮様形態の消失を示した。LAD1がアクチン分子制御を介し細胞遊走を制御するとともに、上皮形態・性質維持に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の進展に関連する分子の検索は複数の研究が存在するが、癌-非癌界面に高発現する分子機能に着目した研究は皆無である。癌-非癌界面での癌の進展機構の解明は癌へと進展していくことが予想される前駆病変すなわち“上皮性異形成”や、前浸潤状態である“上皮内癌”といった病変の早期診断や浸潤癌も含めた早期制癌戦略へとつながりうると考えられ、癌細胞の進展機構解明という生物学的意義とともに治療現場への還元を目指す点で社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that ladinin-1 (LAD1) was highly expressed in cancer tissues adjacent to non-cancerous tissues by proteomic analysis of histopathological specimens of oral squamous cell carcinoma (OSCC). In a present study, we investigated the role of LAD1 in cancer development. LAD1-knockdown OSCC cells by siRNA method showed decreased cell proliferation, decreased planar cell migration, and enhanced three-dimensional cell migration. LAD1 localized to actin fibers in intracellular actin arcs, and inhibition of LAD1 expression resulted in decreased expansion of lamella and loss of epithelial-like cell morphology. These results suggested that LAD1 involved in cell migration through regulation of actin molecule and related to the expression of epithelial morphology and properties.

研究分野：病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 ladinin-1 アクチン

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は、口腔粘膜上皮組織に発生し、発生母地の正常細胞を排除しながら発育・進展する。すなわち、癌の発生と進展の際には、常に癌細胞と非癌細胞が接触し、いずれの細胞が優勢となるかの競争を繰り広げる場が存在することになる。このような癌-非癌細胞の接触部は、口腔扁平上皮癌の病理組織標本ではたびたび目にすることができ、癌-非癌部の明瞭な界面として認識されてきた。このような遺伝子の変異状態の異なる細胞接触界面は、“細胞競合 cell competition”(Johnston, Science 2009)を想起させるものであった。細胞競合では、異なる遺伝子変異状態の細胞間に相対的な勝者(winner)と敗者(loser)の関係が生じ、相互の接触において勝者が敗者を細胞死に向かわせる仮説が提唱されている(Moreno, Nature Rev Cancer 2008)。我々は口腔扁平上皮癌組織を分子発現の面から視覚化を試み、これらの知見を応用することで、細胞競合の観点から病理組織を評価することで、癌-非癌界面には細胞競合の指標となるアポトーシスが亢進することや、タンパク質網羅的解析手法により非癌組織に接する癌組織において特異的に高発現するタンパク質を見出した(Abé, Exp Mol Pathol 2017)。癌-非癌界面部で高発現する蛋白質の中には、アクチン分子制御に関連した機能をもつものが多かったことから、「生体内での癌-非癌界面形成と癌の発生・発育において、特にアクチン分子制御動態制御が重要な役割を担っている」という考えに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、「口腔扁平上皮癌と非癌細胞間における側方浸潤界面では、アクチン分子とその制御分子によって仲介される、癌進展機構の制御と細胞間相互作用が生じている」という仮説を検証することを目的とした。

癌-非癌組織間の相互作用や、癌の発育・進展機構を詳細に解明できれば癌の進展を抑えることや、癌細胞の発生ごく初期における制圧が可能になると考えられる。これらは極めて有効な制癌戦略手法となり、癌治療・制癌治療薬開発における学際的・創造的な基礎研究としての発展が見込まれると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、口腔扁平上皮癌-非癌接触界面におけるタンパク質発現とアクチン細胞骨格分子動態に注目し解析を進めた。

これまでに病理組織標本を用いたプロテオーム解析で癌組織界面部特異的タンパク質として同定された複数の分子の機能解析を行うこととした。アクチン分子との機能的関連が明らかとされている RhoA、profilin 2 などのアクチン線維制御分子に加え、calmodulin-like 5 や ladinin-1 (LAD1)などの機能不明な分子が同定されたことから、これらのタンパク質のなかで、扁平上皮癌における機能がいまだ未解明であった LAD1 に着目し、口腔扁平上皮癌培養細胞株におけるアクチン分子制御機構について、検討を行うこととした。

(1) 口腔扁平上皮癌培養細胞株培養細胞における LAD1 の発現および局在評価

定量的リアルタイム PCR 法・ウェスタンブロッティング・免疫蛍光法を用いて口腔扁平上皮癌培養細胞株(HSC-2, 3, 4)の LAD1 発現状態を検討した。免疫蛍光法によるタンパク質の局在解析には超解像顕微鏡(ELYRA S.1, Zeiss)による高分解能観察を併用した。

(2) siRNA 法による LAD1 機能評価

siRNA 法を用いて LAD1 の発現抑制を行い、細胞増殖・遊走・形態における変化を解析した。

(3) コラーゲン基質上での立体培養における浸潤解析

siRNA 法によって LAD1 発現抑制を行った口腔扁平上皮癌細胞をコラーゲン基質上に積層培養し、上皮平面に垂直な切片を作製することにより、癌のコラーゲンゲル中への浸潤能を評価した。

(4) OSCC 培養細胞を用いた細胞遊走の動的解析

siRNA 法による LAD1 発現抑制を行った口腔扁平上皮癌細胞をディッシュ上に播種し、細胞の遊走状態を、Cytowatcher (ATTO) を用いて 5 分間隔・24 時間のタイムラプス撮影を行い、取得された画像を動画化し、NIS elements AR (Nikon) にて撮影範囲中の個々の細胞の移動軌跡を追跡・解析した。

(5) PCR array による LAD1 抑制細胞における遺伝子発現変動解析

LAD1 発現抑制をおこなった口腔扁平上皮癌細胞における各種遺伝子発現状態の変動を、PCR array 法 (RT² Profiler PCR Array, Qiagen) により検討し、発現変動の大きかった遺伝子から推定される細胞現象について、培養細胞を用いて分子発現の検討を行った。

4. 研究成果

(1) LAD1 の発現を OSCC 細胞株 (HSC-2, 3, 4) を用いて検討すると、これらの細胞株ではいずれの細胞も LAD1 の遺伝子・タンパク質の発現が認められ、その発現量に有意な差は認められなかった。免疫蛍光染色では、細胞質辺縁部に LAD1 の発現が認められ、特に数個の細胞からなる小型の細胞集塊では、集塊の最辺縁に LAD1 陽性が強調される傾向が認められた。

LAD1 の細胞内局在を、超解像顕微鏡観察を用いて観察すると、LAD1 はアクチンアーキと呼ばれるアクチン線維からなる束状構造上に集積する傾向を示していた (図 1)。これらの点から、LAD1 はアクチン分子との密接な機能的関連性が考えられ、特にアクチンアーキへの局在からは、lamella あるいは lamellipodia との関連性が考えられた。

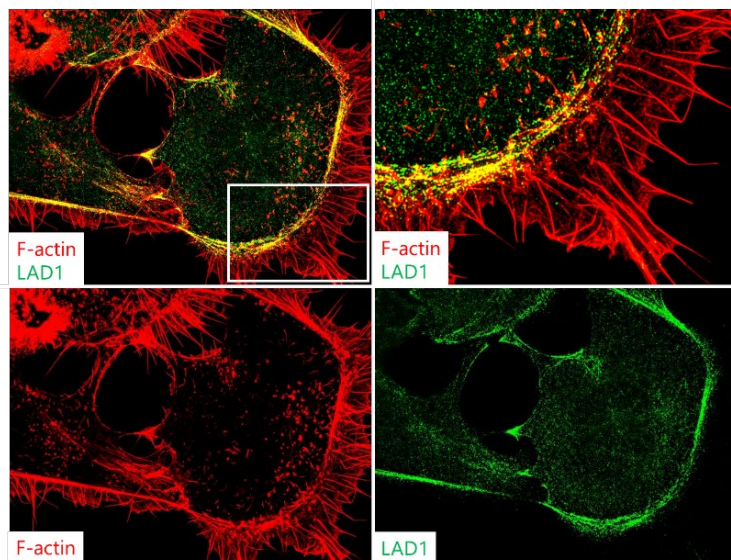


図1: LAD1 のアクチンアーキへの局在

(2) siRNA 法を用い

て、OSCC 細胞株の LAD1 発現を抑制すると、LAD1 抑制細胞は細胞増殖能の抑制を示す傾向がみられ、また、細胞遊走能を評価する方法である wound healing assay では細胞遊走能の低下を示した。一方、同じく細胞遊走能の評価方法である transwell migration assay では wound healing assay とは相反する細胞遊走能の促進を示す結果となった。LAD1 抑制細胞の免疫蛍光染色を併用した形態観察では、LAD1 抑制細胞は lamella の伸展が著しく抑制され、上皮様形態

の減弱が特徴的であると同時に、フィロポディアの形成密度が低下していた(図 2)。これらの結果から、LAD1 はアクチン分子制御に密接にかかわっていると推測されたが、平面的な細胞遊走と三次元的な細胞遊走の結果に解離がみられた点が着目された。

(3) コラーゲン上培養法での三次元的細胞遊走評価を HSC-2, 3, 4 の各細胞株を用いて検討したところ、コラーゲン内への癌細胞の浸潤度の増加が認められた。

(4) 一方、タイムラプス撮影法を用いた平面的細胞遊走評価を HSC-4 細胞株を用いて行ったところ、タイムラプス撮影動画解析では LAD1 抑制細胞の細胞移動速度の低下がみられ、コラーゲン上培養浸潤評価法ではこれらの結果は、OSCC 細胞株の遊走において、LAD1 の発現量は細胞の平面的遊走と立体的遊走を相反的に制御している可能性を示唆するものであった。

(5) PCR array による LAD1 抑制細胞における遺伝子発現変動の評価では、LAD1 抑制細胞では、細胞遊走関連遺伝子のうち、caveolin-1 などの遺伝子発現の減少が明らかとなった。caveolin-1 は、細胞の平面的運動と三次元的運動において異なった局在を示すことが報告されており(Parat, Mol Biol Cell 2003)、前述の細胞遊走の平面的および三次元的制御に密接にかかわっている可能性が考えられた。また、上皮-間葉転換(EMT)に関連した遺伝子の発現変動も PCR array によって検討したところ、EMT における間葉系細胞の表現型が顕れている可能性が見いだされた。なかでも EMT および細胞平面極性に関わる WNT5a の発現上昇が認められ、LAD1 を抑制した HSC-2 および HSC-4 で有意な発現増加が確認された。LAD1 抑制細胞は免疫蛍光法による検討で、vimentin 陽性細胞率の増加と、E-cadherin 膜陽性像の減少を示したことから、LAD1 の発現は上皮様性質の維持においても重要な因子と考えられた。

今回の研究を計画するに至った細胞競合現象については未解明な点が多いが、哺乳類尿路上皮細胞における細胞競合現象において、Rho タンパク質の調節を受けた filamin 分子によって仲介されることが報告され(Kajita, Nat Commun 2014)、ミオシンやビメンチンなどの細胞骨格と細胞競合現象の関連性が注目されるようになった。今回の研究で明らかとなった LAD1 のアクチン制御への関連とともに、LAD1 は filamin A と関連する分子であることが明らかとなっており(Roth, Sci Signal 2018)、癌-非癌細胞界面において非癌組織に接する癌組織において高発現を示した LAD1 が、アクチン分子制御に関連している可能性を示唆する結果は、LAD1 が細胞競合などの癌-非癌細胞間相互作用に密接に関連している可能性を考察させるものであった。また、癌組織内においてもLAD1は、癌-非癌界面部に近い癌組織に比べて、界面から遠い癌組織では LAD1 の発現量は相対的に低いことが示されており、癌組織内の不均一性や、さらには癌が上皮内を進展していくのか、もしくは間質方向に浸潤していくのか、という癌の進展方向性を決定するメカニズムにも関連している可能性も考えられ、今後のさらなる研究展開が望まれた。

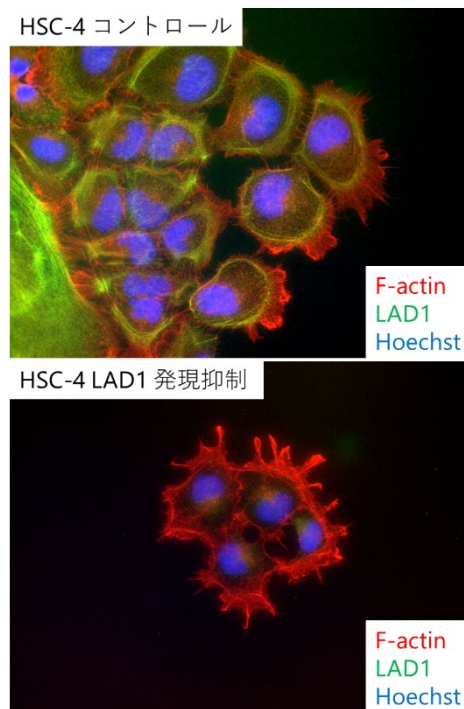


図2: LAD1 発現抑制による形態変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 阿部 達也, 味岡 洋一, 山崎 学, 丸山 智
2. 発表標題 アクチン分子を介したladinin-1の口腔扁平上皮癌細胞増殖・遊走制御機構
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 達也, 味岡 洋一, 山崎 学, 丸山 智
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における ladinin-1 の細胞形態・増殖・遊走制御機構
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Abe, Manabu Yamazaki, Satoshi Maruyama, Jun-ichi Tanuma, Yoichi Ajioka
2. 発表標題 Ladinin-1, overexpressed in oral squamous cell carcinoma adjacent to non-cancerous epithelium, is involved in cell motility by mediating actin and focal adhesion dynamics
3. 学会等名 32nd Congress of the European Society of Pathology and XXXIII International Congress of the International Academy of Pathology Congress and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部 達也, 丸山 智, 山崎 学, 味岡洋一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるladinin-1 の機能解析
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 達也, 丸山 智, 山崎 学, 味岡洋一
2. 発表標題 Ladinin-1 はアクチン分子動態の調整を介し、口腔扁平上皮癌細胞の増殖と遊走を制御する
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会総会・第11回日本口腔検査学会総会・共催学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Abe, Manabu Yamazaki, Satoshi Maruyama, Yoichi Ajioka
2. 発表標題 Ladinin-1 is involved in cell motility and proliferation of oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 joint IAOP-AAOMP meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 達也, 味岡 洋一, 山崎 学, 丸山 智
2. 発表標題 アクチン分子を介したladinin-1の口腔扁平上皮癌細胞増殖・遊走制御機構
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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	丸山 智 (Maruyama Satoshi) (30397161)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	柿原 嘉人 (Kakihara Yoshito) (40379938)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関