

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17026

研究課題名(和文) 癌の螺旋状悪性化モデルの解析

研究課題名(英文) Analysis of spiral malignant transformation model of cancer

研究代表者

藤林 えみ (FUJIBAYASHI, Emi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・その他部局等・口腔外科・レジデント

研究者番号：70802718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)や間葉上皮転換(以下MET)による浸潤転移や、そのEMTによって癌細胞が幹細胞性を獲得し、放射線や化学療法への抵抗性を獲得することが癌治療において重要な問題点である。我々はEMT-METを連続して誘導した細胞株を樹立し、EMT-METの不可逆性を示し「EMT-MET誘導性螺旋状悪性化メカニズム」として提唱した。本研究ではEMT-METにおけるSphere形成能および放射線・化学療法抵抗性の獲得には、分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療の標的として分子メカニズムを明らかにすることは重要である。我々は、形成能および放射線・化学療法抵抗性の獲得に、Sphere形成能の獲得に胚の正常発生に関連するソニックヘッジホッグシグナル伝達を制御する因子の一つであるHHAT(Hedgehog acyltransferase)が関連している可能性について報告した。しかし、このHHATはEMT-MET誘導性螺旋状悪性化には関連していないことが明らかとなり、螺旋状悪性化にはHippo pathwayの破綻が重要であり、生じる細胞動態の変化を検証することで、高い浸潤能を有する螺旋状悪性化した細胞の動態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Important problems in cancer treatment are to acquire infiltration metastasis by epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-epithelial transition (MET), and resistance to radiation and chemotherapy due to stem cell nature. We established a cell line that continuously induced EMT-MET. Then, it showed the irreversibility of EMT-MET and proposed it as "EMT-MET-induced spiral malignant transformation mechanism". In this study, we clarified the molecular mechanism for the acquisition of Sphere formation ability and radiation / chemotherapy resistance in EMT-MET.

研究分野：口腔外科

キーワード：癌の悪性化 浸潤転移

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は本邦において全癌の約 1%、全頭頸部癌の約 40%を占め、そのうち 90%が口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: 以下 OSCC) である。局所切除にて良好な予後が得られる症例が多い一方、浸潤や局所再発、頸部リンパ節転移、遠隔転移により予後不良となる症例も散在する。この浸潤や転移、治療抵抗性の獲得メカニズムを明らかにすることは、治療方針の決定だけでなく、予後予測にも大きな影響を与える。舌癌において、予後に影響する重要な因子として、原発巣の制御が挙げられており、原発巣の再発の可能性を治療前に予測することが重要である。腫瘍の浸潤や転移に上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: 以下 EMT) が深く関わっていることが知られている (Nieto ら:2016, Cell)。癌細胞が浸潤・転移するには、原発巣からの離脱と間質への浸潤、脈管侵襲、体内循環、転移先の血管への接着、血管外への浸潤、転移先臓器への定着と増殖の過程が必要となる。癌細胞は細胞極性やアクチン骨格極性を失い、間葉細胞へ変化する EMT によって、移動能・浸潤能を獲得・増強し、播種や転移が可能となる。また近年、転移臓器においては、間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: 以下 MET) により、間葉系に転換されていた癌細胞が上皮系癌細胞となり、細胞増殖を伴った転移性コロニー形成が促され、転移先臓器への浸潤・定着が可能になることが示唆されている (Kim ら:2016, Semin. Cell Dev. Biol.) EMT の分子機構に関しては多方面から研究が進められている (Lamouille ら:2014, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.) 反面、MET に関しては不明な点が多く、詳細な EMT と MET の関連も明らかになっていない。

2. 研究の目的

EMT と MET に関しては現在研究が進められてきている段階であり、以前から異なる経路をたどると指摘されてきたが、詳細な分子機構の差異は明らかになっていない。本研究では EMT と MET の分子機構の違いを明らかにすること、また悪性化の原因となる治療抵抗性獲得のメカニズムを解明することを目的とした。

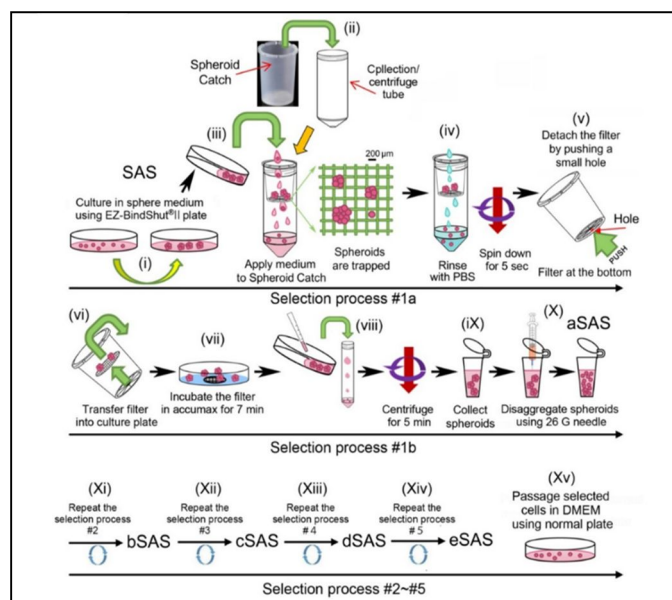
3. 研究の方法

・ Sphere 形成能の高い細胞株 eSAS 株の樹立

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を使用し、低接着性プレートを用いて Sphere 形成を誘導し、Spheroid Catch (共同研究者である大阪大学微生物病研究所野島、藪田らと WATSON 株式会社にて開発) を通過させ、200 μm の孔よりも大きな Sphere のみを選択的に回収する。この工程を繰り返すことで、高い Sphere 形成能を有した細胞株 eSAS を樹立した (図 1)。

・ EMT-MET 誘導性細胞株 SAS- と Sphere 形成誘導性細胞株 eSAS の比較

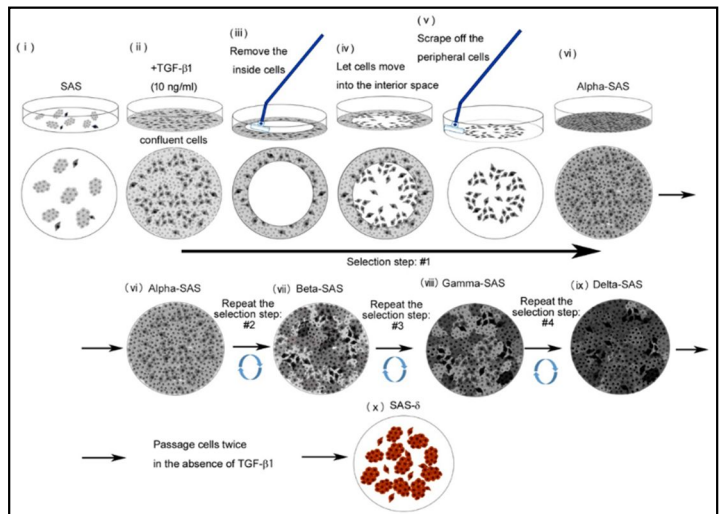
EMT-MET 誘導性螺旋状悪性化メカニズムを提唱した際に樹立した SAS- 細胞株 (図 2) と、本研



究で樹立した Sphere 形成誘導性細胞株 eSAS の遺伝子・タンパク質の発現レベル、シグナル稼働、性質の比較検討を進めた。

DNA マイクロアレイによる細胞の遺伝子発現量変化の検証

大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターへ解析を依頼し、遺伝子発現量の変化を明らかにする。この結果からある遺伝子の発現上昇が明らかになれば、それが EMT-MET および Sphere 形成のどの段階に必要であるのか発展して検証した。



細胞の悪性度（遊走能・浸潤能・増殖能・放射線化学療法抵抗性）の検証

申請者が提唱した EMT-MET 誘導性螺旋状悪性化メカニズムは、EMT および MET を経た SAS- 株が、高い上皮性の性質を有しながらも、高い Sphere 形成能や放射線化学療法抵抗性を有し、さらに in vivo でマウスの舌に腫瘍を移植する実験においては、高い悪性度を示した。この悪性化が高い Sphere 形成能を有するという特徴による結果であるのであれば、Sphere 形成誘導性 eSAS も SAS- と同様の悪性度を獲得していると推測されたため検証し、SAS- と eSAS を比較することで、SAS- のも幹細胞性や治療抵抗性が、どのような機序により獲得されているのか明らかにした。

4. 研究成果

EMT-MET 誘導性細胞株 SAS-、Sphere 形成誘導性細胞株 eSAS とともに高い Sphere 形成能を獲得していたが、遊走能、浸潤能は低下した。また、細胞増殖率を比較すると、SAS- は SAS および eSAS が定常期に入っている時期においても、対数増殖期である様子を示し、足場非依存的な増殖能の獲得が示唆されたのに反し、eSAS は増殖速度が低下した。

この細胞増殖に関連するといわれる Hippo pathway を検討した結果、eSAS は Yap/Taz のリン酸化が低く、Lats から下流へのリン酸化率が低下していることが示唆された一方、Hippo pathway の稼働が上流から低下している可能性が示唆された。

この SAS、SAS-、eSAS を 3 群間で DNA マイクロアレイ解析を行うと、Hedgehog acyltransferase が eSAS でのみ高発現であることが明らかとなり、この HHAT が癌幹細胞の持つ高い Sphere 形成能の重要な因子である可能性が示唆された。この HHAT 阻害剤を投与すると、10 μM 以上だとすべての群で Sphere 形成が阻害されましたが、低濃度だと、SAS、eSAS では阻害され、SAS- は阻害されなかった。

このことから、癌幹細胞の特性である Sphere 形成能には、HHAT が関連するが、EMT-MET を経て獲得された Sphere 形成能には Hippo pathway の異常が関連している可能性が示唆された。つまり、Self-renewal という同じ性質を有していても異なる治療標的が存在するか可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Emi Fujibayashi, Norikazu Yabuta, Yukihiro Nishikawa, Toshihiro Uchihashi, Daisaku Miura, Kyoko Kurioka, Susumu Tanaka, Mikihiro Kogo and Hiroshi Nojima	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation of cancer cells with augmented spheroid-forming capability using a novel tool equipped with removable filter.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33931-33946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26092	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤林えみ 栗岡恭子 内橋俊大 田中晋 古郷幹彦
2. 発表標題 スフェロイドキャッチによるスフェロイド形成能を有するがん細胞の選択分離方法の確立
3. 学会等名 第64回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤林えみ 内橋俊大 須河内昭成 平岡慎一郎 相川友直 古郷幹彦
2. 発表標題 上皮間葉転換とスフェア形成能との関連についての検討
3. 学会等名 第38回 日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------