

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10073

研究課題名（和文）唾液腺腫瘍組織発生における亜鉛シグナル制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of zinc signaling in the histogenesis of salivary gland tumor

研究代表者

入江 太朗（Irie, Tarou）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：00317570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：唾液腺腫瘍組織発生の詳細は今日まで明らかにはなっていない。本研究では唾液腺腫瘍組織発生の初期イベントを明らかにすることを目的として正常ヒト唾液腺の腺房細胞と導管細胞における PLAG1 の役割について解析を行った。PLAG1 は正常唾液腺腺房細胞において幹細胞性を細胞腫特異的に増強した。また正常唾液腺腺房細胞において PLAG1 を過剰発現すると発現増加する遺伝子が Wnt や Rap1 などの幹細胞性に関与するシグナル伝達経路を亢進することが示された。唾液腺細胞において PLAG1 が幹細胞性を増強する分子メカニズムを解明することにより唾液腺腫瘍組織発生機構のさらなる詳細が明らかとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺腫瘍は極めて多彩な組織像を呈する上、30種類以上の腫瘍型や種々の亜型が存在しており、病理診断上の鑑別診断を困難にしている。これは極めて初期段階の腫瘍組織の発生を解析できず、唾液腺腫瘍の組織発生が仮説の域を出ないものとなってしまっているためである。これにより唾液腺腫瘍分類そのものが複雑化せざるを得ず、病理医間の診断再現性の低下を招き、結果として患者のQOLを損ないかねない危険性が残された状況にある。唾液腺腫瘍の組織発生とその制御要因の詳細な理解に立脚した新たな唾液腺腫瘍の疾患概念の構築は、診断・治療や患者のQOL向上に対して大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Details of tumorigenesis of salivary glands remain unclear. In this study, we analyzed the role of PLAG1 in acinar and ductal cells of normal human salivary glands to elucidate the early events of tumorigenesis of the salivary glands. Overexpression of PLAG1 in acinar cells of normal salivary gland upregulated genes involved in stemness, such as Wnt and Rap1. Our results suggest that elucidation of the molecular mechanism by which PLAG1 enhances stemness profiles in salivary gland cells will provide further details on the mechanism of salivary gland tumorigenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺腫瘍モデル 腫瘍組織発生 PLAG1 腺房細胞 唾液腺腫瘍

1. 研究開始当初の背景

唾液腺腫瘍は臨床病理学的には頭頸部腫瘍の約 5~6% を占め、そのうち約 40% は悪性腫瘍である。唾液腺腫瘍は極めて多彩な組織像を呈する上、30 種類以上の腫瘍型や種々の亜型が存在しており、さらに分類が異なる腫瘍型にもかかわらず部分的に共通した組織像を有することから、病理診断上の鑑別診断を困難にしている。これは摘出された手術材料を解析しても、その標本内においては病変が既に完成してしまっており、極めて初期段階の腫瘍組織の発生を解析できず、唾液腺腫瘍の組織発生が仮説の域を出ないものとなってしまっているためである。これにより唾液腺腫瘍分類そのものが複雑化せざるを得ず、病理医間の診断再現性の低下を招き、結果として患者の QOL を損ないかねない危険性が残された状況にある。唾液腺腫瘍の組織発生とその制御要因の詳細な理解に立脚した新たな唾液腺腫瘍の疾患概念の構築は、診断・治療や患者の QOL 向上に対して大きな意義を持つこととなる。しかし、現在までに、唾液腺腫瘍への運命づけあるいはそれが完了した細胞が腫瘍塊を形成する過程において、その成長発育がいかなる因子により制御されているのかは未だ明らかではない。

唾液腺腫瘍の組織型は多彩ではあるものの、大きく 3 つの組織構築パターンに大別される。管腔側細胞(導管上皮/腺房細胞)よりなるもの、管腔側細胞と非管腔側細胞(筋上皮/基底細胞)よりなるものと非管腔側細胞のみからなるものである。現在の癌幹細胞の概念は、「クローナル進化」の考え方が一般的となりつつあるが、これは単一のクローンに由来する細胞集団の中で遺伝子変異の蓄積によりさらに別の形質を獲得したクローンが選択されていくと言う概念であり、これは分化方向が規定された異なる癌幹細胞が階層化を成すことを意味する。我々は「クローナル進化」の概念を唾液腺腫瘍の組織構築パターンに応用し、唾液腺腫瘍の多様性は分化方向が規定された異なる腫瘍幹細胞に基づいており、それぞれの腫瘍幹細胞は階層化を成すという仮説を立てた。そこで正常な唾液腺組織において、特定の唾液腺細胞のみを人為的に腫瘍化し、唾液腺腫瘍に特徴的な多様性に富む組織構築の形成過程を詳細に病理組織学的に捉えることを可能とする腫瘍発生モデル構築を目指して、任意の唾液腺構成細胞が時期・由来細胞特異的に腫瘍原性遺伝子 *Plag1* を発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作成し、唾液腺幹細胞を含む唾液腺導管上皮細胞の population のみに *plag1* を過剰発現させたところ、時期・部位特異的な *Plag1* の過剰発現による唾液腺腫瘍モデルマウスの創出に成功するに到った。このマウスを用いて「正常な唾液腺組織内において、特定の細胞のみが遺伝子変異を生じて腫瘍組織を形成する」現実の腫瘍発生様式を完全に再現し、腫瘍幹細胞の起源の違いにより個々の唾液腺腫瘍が発生することや、それがいかなる制御下にあるのかを解析しうる手段を得た状況となっていた。

2. 研究の目的

本研究では「亜鉛シグナル」に着目し、亜鉛シグナルを介した唾液腺腫瘍の組織発生過程における腫瘍成長発育制御機構の全容解明を目指す。近年、亜鉛はシグナル因子として機能することが明らかになり、その亜鉛シグナルは特異性を持って様々な細胞機能を制御していることが明らかとなりつつある。我々は既に亜鉛シグナルが「腫瘍」においても重要な役割を果たしている可能性を皮膚付属器腫瘍(*Br J Dermatol.* 2018)や B 細胞性リンパ腫(*Proc Natl Acad Sci USA.* 111:11780-5, 2014)において明らかにしてきた。本研究では様々な細胞機能を制御することが明らかになりつつある「亜鉛シグナル」に焦点を当て、唾液腺腫瘍初期組織発生から腫瘍塊形成過程における亜鉛シグナルを介した腫瘍発育制御機構について遺伝子改変マウスを用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本成果報告書においては、亜鉛シグナルを介した唾液腺腫瘍の組織発生過程に関するデータについては現在、論文投稿準備中となっているために、*Plag1* の過剰発現により正常唾液腺の導管上皮細胞あるいは腺房細胞においていかなるものが生じるのかについて検討した成果を主に報告する。

本研究ではヒト正常唾液腺組織から細胞種毎に単離しその後 SV40 origin-defective mutant DNA の導入により不死化された唾液腺細胞株[腺房細胞(NS-SV-AC)および導管上皮細胞(NS-SV-DC)]を使用した。2 種類のヒト正常唾液腺細胞株の各々についてトランスフェクション試薬を用いた遺伝子導入を行い細胞内にて *PLAG1* を過剰発現させた。*PLAG1* の発現量はそれぞれの細胞からタンパク抽出を行い Western Blotting 法にて確認した。その条件下にて、細胞増殖能および浸潤能への影響について確認した。続いて Matrigel を使用した salsphere culture を行い、約 2 週間後 qRT-PCR および蛍光免疫染色により唾液腺構成細胞への分化および幹細胞的性格の獲得について比較・検討を行った。さらに Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法による遺伝子の発現プロファイルとシグナル伝達パスウェイ解析から *PLAG1* 過剰発現により変化するシグナル経路について網羅的に探索した。

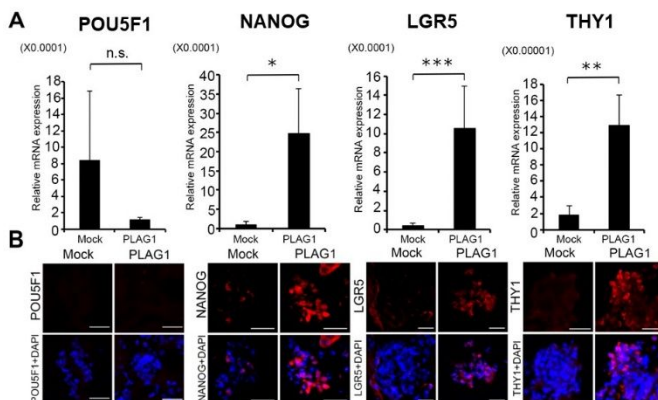
4. 研究成果

Cell Proliferation Assay と Matrigel Transwell Migration Assay の結果より *PLAG1* は腺房細胞・導

管上皮細胞とともに細胞増殖能および浸潤能を亢進させた。PLAG1 による唾液腺構成細胞への分化および幹細胞的性格獲得への影響については Matrigel による *in vitro* の salsisphere culture を行ったところ、PLAG1 導入腺房細胞では qRT-PCR 解析より Aquaporin5、Cytokeratin18 の mRNA 発現増加がみられた。一方、PLAG1 導入導管上皮細胞においては Cytokeratin14 のみ減少が認められた。また、PLAG1 導入腺房細胞では幹細胞マーカーである NANOG、LGR5、THY1 の mRNA の発現が増加した。PLAG1 導入導管上皮細胞では THY1 のみ mRNA 発現の増加がみられた。蛍光免疫染色においてもそれぞれ qRT-PCR と概ね同様の結果が得られた。さらに CAGE 法による発現遺伝子の解析とシグナルパスウェイ解析により、PLAG1 過剰発現時腺房細胞で発現が亢進される遺伝子はがん化または幹細胞性に関連したシグナル伝達経路に、同様に導管上皮細胞で亢進する遺伝子はがん化に関連するシグナル伝達経路に関与しているものであることが明らかとなった。

本研究において PLAG1 は正常唾液腺腺房細胞において幹細胞性を細胞腫特異的に増強した。これまでに造血系や神経系細胞において PLAG1 が幹細胞性に関与する可能性が報告されている。また CAGE 法による遺伝子解析により正常唾液腺腺房細胞において PLAG1 を過剰発現すると発現増加する遺伝子が Wnt や Rap1 などの幹細胞性に関与するシグナル伝達経路を亢進することが示された。今後は唾液腺細胞において PLAG1 が幹細胞性を増強する分子メカニズムを解明することにより唾液腺腫瘍組織発生機構のさらなる詳細が明らかとなる可能性が示唆された。

PLAG1 enhances the stemness profiles in acinar cells



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Yasuhara Rika, Kang Seya, Irie Tarou, Mabuchi Yo, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Ishida Shoko, Tanaka Junichi, Mishima Kenji	4. 巻 102
2. 論文標題 Role of Snai2 and Notch signaling in salivary gland myoepithelial cell fate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-022-00814-7	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 -
1. 著者名 Taichi Ishikawa, Daisuke Sasaki, Ryo Aizawa, Matsuo Yamamoto, Takashi Yaegashi, Tarou Irie, Minoru Sasaki	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Lactic Acid on Wound Healing, Cell Growth, Cell Cycle Kinetics, and Gene Expression of Cultured Junctional Epithelium Cells in the Pathophysiology of Periodontal Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10111507	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 Keisuke Sawada, Shuji Momose, Ryutaro Kawano, Masakazu Kohda, Tarou Irie, Kenji Mishima, Takahiro Kaneko, Norio Horie, Yasushi Okazaki, Morihiro Higashi, Jun-ichi Tamaru	4. 巻 35
2. 論文標題 Immunohistochemical staining patterns of p53 predict the mutational status of TP53 in oral epithelial dysplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 177-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-021-00893-9	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 -
1. 著者名 Taichi Ishikawa, Daisuke Sasaki, Ryo Aizawa, Yu Shimoyama, Matsuo Yamamoto, Tarou Irie, Minoru Sasaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Butyric Acid in the Proliferation and Migration of Junctional Epithelium in the Progression of Periodontitis: An In Vitro Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj9040044	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 Takeo Makoto, Asakawa Kyosuke, Toyoshima Koh-ei, Ogawa Miho, Tong JingJing, Irie Tarou, Yanagisawa Masayuki, Sato Akio, Tsuji Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Expansion and characterization of epithelial stem cells with potential for cyclical hair regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80624-3	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 -

1. 著者名 Lee Mi-Gi, Chae Sehyun, Nakajima Kimiko, Ibi Miho, Sano Hozumi, Hara Takafumi, Jo Hantae, Takagishi Teruhisa, Cha Byungsun, Baek Jin-myoung, Yoshigai Emi, Ohashi Takuto, Irie Tarou, Sano Shigetoshi, Lee Jong-Soo, Fukada Toshiyuki, Bin Bum-Ho	4. 巻 98
2. 論文標題 Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 203 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.04.010	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 -

1. 著者名 Goto Yuriko, Ibi Miho, Sato Hirotsuka, Tanaka Junichi, Yasuhara Rika, Aota Keiko, Azuma Masayuki, Fukada Toshiyuki, Mishima Kenji, Irie Tarou	4. 巻 62
2. 論文標題 PLAG1 enhances the stemness profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.002	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 衣斐美歩、羽金雅登、佐藤泰生、入江太郎
2. 発表標題 唾液腺腫瘍組織発生解明にむけて - 唾液腺腫瘍モデルマウスの創出 -
3. 学会等名 第3回岩手県歯科医師会・岩手医科大学歯学会共催シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣斐美歩, 佐藤泰生, 羽金雅登, 田中準一, 安原理佳, 美島健二, 入江太郎
2. 発表標題 Generation of salivary gland tumor model in mice
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miho Ibi, Hirotaka Sato, Masato Hagane, Junichi Tanaka, Rika Yasuhara, Kenji Mishima, Tarou Irie
2. 発表標題 Generation of salivary gland tumor model in mice and its histopathological analysis
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuriko Goto, Miho Ibi, Hirotaka Sato, Junichi Tanaka, Rika Yasuhara, Masayuki Azuma, Toshiyuki Fukada, Kenji Mishima, Tarou Irie
2. 発表標題 PLAG1 enhances stemness in acinar cells of normal human salivary gland in cell type-specific manner
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
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
研究分担者	深田 俊幸 (Fukada Toshiyuki) (70373363)	徳島文理大学・薬学部・教授 (36102)	

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	衣斐 美歩 (Ibi Miho) (30609665)	岩手医科大学・歯学部・特任講師 (31201)	
研究分担者	佐藤 泰生 (Sato Hirotaka) (40244941)	岩手医科大学・歯学部・講師 (31201)	

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