

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10342

研究課題名(和文) RNA編集酵素を標的とした癌幹細胞の自己複製制御による新しい口腔癌治療の開発

研究課題名(英文) Targeting therapy of oral cancer stem cell renewal by RNA editing enzyme

研究代表者

奥村 一彦 (Okumura, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：60194510

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)：ヒト口腔扁平上皮癌細胞SASと、SAS-H1(高浸潤性)、SAS-L1(低浸潤性)を用い、球形集塊形成によって癌幹細胞を樹立した。CD44、CD133がいずれの癌幹細胞でも強い発現がみられた。また、SAS-H1と親株SASから得られた癌幹細胞は、ADAR1 mRNA発現が亢進していた。癌幹細胞では、ADAR阻害剤によって増殖抑制がみられ癌細胞の浸潤能が低下した。次に、癌幹細胞でsi-ADAR1導入した結果、SOX2とPOU5F1発現が低下し、上皮-間葉転換により、癌幹細胞は間葉細胞の性格を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は、自己複製の能力を保持しており様々な異種分化する細胞を生成する能力があることから、腫瘍組織では不均一な癌細胞の集団を形成すること示唆されている。そこで、本研究では口腔癌の化学療法や放射線療法に対する抵抗性と再発・転移に関与するものが癌幹細胞であることが示唆されている。そこで、癌幹細胞の自己複製を制御している可能性があるRNA編集酵素であるADAR1に着目し、ADAR1を介した細胞内シグナル伝達経路を検討することで、新しい癌幹細胞を標的とした治療戦略の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells were generated from human oral squamous cell carcinoma cells SAS, SAS-H1 (highly invasive) and SAS-L1 (low invasive) by spheroid formation, with strong expression of CD44 and CD133 in both cancer stem cells. Cancer stem cells from SAS-H1 and the parental strain SAS also showed increased ADAR1 mRNA expression. In cancer stem cells, ADAR inhibitors inhibited proliferation and reduced the invasive potential of cancer cells. Next, si-ADAR1 transduction in cancer stem cells resulted in reduced SOX2 and POU5F1 expression, and the cancer stem cells acquired a mesenchymal character through epithelial-mesenchymal transition.

研究分野：口腔外科学

キーワード：癌幹細胞 スフェロイド形成 RNA編集酵素ADAR1 上皮-間葉転換誘導

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の発症頻度は、我が国における超高齢化社会の出現とともに増加している。癌治療の主軸は手術療法であるが、化学療法や放射線療法に抵抗性を保持している癌細胞が存在することから、術後の再発や転移によって予後が不良となる例が散見される。これらの治療抵抗性の原因として、腫瘍組織内に存在する小集団の癌細胞である癌幹細胞によることが報告されている。この癌幹細胞は、自己複製の能力を保持しており様々な異種分化する細胞を生成する能力があることから、腫瘍組織では不均一な癌細胞の集団を形成すること示唆されている。そこで、本研究では口腔癌の化学療法や放射線療法に対する抵抗性と再発・転移に關する癌幹細胞を標的とする新しい治療法の開発に向けた研究を行うものである。

癌幹細胞の自己複製を制御している可能性がある RNA 編集酵素である ADAR1 に着目し、ADAR1 を介した細胞内シグナル伝達経路を検討することとした。ADAR は、ヒトで 3 種類のタンパク質を発現しており、RNA 編集に依存しない作用として遺伝子発現の調節、miRNA の生成等の様々な生物学的作用のあることが近年知られてきた。なかでも、ADAR1 は癌細胞において重要な役割を担っていることが報告され、実際に ADAR1 の発現上昇が固形癌で認められており、予後不良と關連することが示唆されている。

2. 研究の目的

- (1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株からの癌幹細胞の樹立を試みる。
- (2) 樹立された癌幹細胞における ADAR1 の異常の解析を行う。
- (3) 癌幹細胞の ADAR1 を介した細胞内シグナル伝達機構を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト扁平上皮癌細胞からの癌幹細胞の樹立

舌原発巣由来扁平上皮癌細胞株 SAS と、この親株から樹立した浸潤性の異なる高浸潤性 SAS-H1 細胞及び低浸潤性 SAS-L1 細胞を用いた。低接着性表面を持つ細胞培養プレートである EZSHERE SP (球状細胞集塊形成培養器) で、血清非存在下で上皮成長因子と塩基性線維芽細胞増殖因子と B-27 を添加し 5 日間の培養を行い、培養皿の基質面に接着しない球状細胞集塊 (スフェロイド) の形成を行った。その後、スフェロイドを回収するために Spheroid Catch を用いた。回収したスフェロイドは、Trypsin/EDTA 液で懸濁し細胞分散を行った。その後、25G の注射針を取り付けた 1mL シリンジで吸引と放出を繰り返すことで単一細胞を分離した。以上の過程を繰り返し 10 回行い大型のスフェロイドを得ることを期待した。

(2) 癌幹細胞マーカーの検索

癌幹細胞の表面マーカーとして知られている CD44、CD133、CD29 と、癌幹細胞の自己複製能を示すマーカーである OCT-4、Nanog、SOX2、Nestin の発現について RT-PCR による mRNA の遺伝子発現とウエスタンブロット法によるタンパク質発現を検討した。

(3) RNA 編集酵素 ADAR1 の発現

スフェロイドから得られた癌幹細胞と出発点となった親株細胞と比較して、ADAR1 の発現量を定量的 RT-PCR 法で測定した。

(4) スフェロイド形成能が維持されている癌幹細胞における ADAR1 の役割

ADAR1 阻害薬である EHNA 塩酸塩と pentostatin を用いて、細胞増殖活性を検討した。

(5) 細胞浸潤能と細胞遊走能の測定

トランスウェルチャンバーを用いて、細胞浸潤能の測定を行った。あらかじめ基底膜物質マトリゲルを膜表面にコートした。血清無添加の DMEM 2mL を入れた上層のチャンバーに細胞を播種し、下層のチャンバーには 10%FBS 添加 DMEM のみを加え、72 時間培養後、綿棒の先でこすり、上層チャンバー内の細胞を除去した。次に、Diff-Quik キットで膜下面の細胞を染色した。同様トランスウェルチャンバーを用いて、細胞遊走の測定を行った。浸潤または遊走した細胞数を測定した。

(6) 基質分解酵素産生能の検討

樹立した癌幹細胞を、10%FBS 添加 DMEM/F12 培養液で 5 日間培養しその培養上清を得た。培養上清を濃縮して、ゼラチンゼイモグラフィーによる基質分解酵素産生能を検討した。

(7) siRNA による ADAR1 ノックダウンと細胞導入

ADAR1 ノックダウンによる形質変化を解析するため、ADAR1 遺伝子に特異性を持つショートヘアピン RNAs (shRNA) 構造を持つ siRNA を合成した。合成した siRNA を電気穿孔法で細胞導入し

た。ノックダウン効率は48時間培養後に測定した。また、細胞導入後に、低接着性細胞培養プレート EZSHERE SP(球状細胞集塊形成培養器)で、血清非存在下で5日間培養しスフェロイド形成させた細胞を用いた。

(8)上皮 間葉転換誘導

癌幹細胞が発現する ADAR1 が上皮 間葉転換誘導にどのような役割を担っているかを検討するため、10 ng/ml の TGF- β を培養液に添加し24時間処理した。

(9)細胞増殖能

細胞を96ウェル培養プレートに、1ウェル当たり 6×10^3 の密度で培養し、一昼夜経過した時点から12, 24, 36, 48, 72時間後の細胞増殖能をMTTアッセイで測定した。測定にはマイクロプレートリーダーを用いた。

4. 研究成果

(1)ヒト扁平上皮癌細胞からの癌幹細胞の樹立

舌原発巣由来扁平上皮癌細胞株 SAS と、この親株から樹立した浸潤性の異なる高浸潤性 SAS-H1 細胞及び低浸潤性 SAS-L1 細胞を用いた。各細胞を EZSHERE SP によるスフェロイド形成培養器で血清非存在下で培養皿の基質面に接着しないスフェロイドを回収することで、癌幹細胞を得ることとした。最初に得られたスフェロイドをスフェロイド・キャッチで回収し、再びスフェロイドを形成させる作業を当初、5回繰り返し、さらに続けて10回まで繰り返した。

その結果、親株である SAS 細胞では、スフェロイド形成を繰り返すごとに、スフェロイドの形成率とスフェロイドの増大が観察された。また、5回と10回の繰り返して得られたスフェロイドを比較すると、5回目のスフェロイド形成時間より10回目のスフェロイド形成時間の方が短時間であることが示された。同様に、高浸潤性 SAS-H1 細胞と低浸潤性 SAS-L1 細胞を用いてスフェロイド形成を5回試みたところ、親株 SAS 細胞と比較して高浸潤性 SAS-H1 細胞はスフェロイド形成率はやや低下する傾向にあり、さらに、低浸潤性 SAS-L1 細胞からのスフェロイド形成率は顕著に低下していた。

(2)癌幹細胞マーカーの検索

繰り返しスフェロイド形成を行って得られた癌細胞について幹細胞表面マーカーの検索を行った結果、親株 SAS 細胞から得られた5~10回繰り返しスフェロイド形成細胞で、CD44、CD133、CD29 の mRNA 発現とともにタンパク質発現も認められた。同様の傾向は、高浸潤性 SAS-H1 細胞でもみられたが、発現量は親株 SAS 細胞より低下しており、低浸潤性 SAS-L1 細胞においては、発現がみられなかった。また、自己複製の能力を示すマーカーとして知られている OCT-4、Nanog、SOX2、Nestin の発現程度は、幹細胞表面マーカーと同程度で、親株 SAS 細胞が発現量が強く、ついで、高浸潤性 SAS-H1 細胞がやや減弱して発現しており、低浸潤性 SAS-L1 細胞では、ともに発現がみられなかった。

(3)癌幹細胞の細胞増殖能

スフェロイドから得られた癌幹細胞の細胞増殖能について検討した。その結果、親株 SAS 細胞から樹立した癌幹細胞は、スフェロイド形成前の細胞と比較し増殖性が低下していた。また、高浸潤性 SAS-H1 細胞と低浸潤性 SAS-L1 細胞から得られた癌幹細胞と各々のスフェロイド形成前の細胞と比較した結果、いずれも増殖能に変化はみられなかった。

(4)RNA 編集酵素 ADAR1 の発現

幹細胞表面マーカーと自己複製の能力を示すマーカーを発現しているものを癌幹細胞と位置づけ RNA 編集酵素 ADAR1 の発現変化を検討した。その結果、癌幹細胞を樹立前の各々の細胞と比較して、親株 SAS 細胞と高浸潤性 SAS-H1 細胞から得られた癌幹細胞では、ADAR1 の mRNA とタンパク質発現が亢進していた。一方、低浸潤性 SAS-L1 細胞から得られた癌幹細胞は、癌幹細胞樹立前の細胞と同様に発現はしていたが、その差はみられなかった。ADAR1 の発現量は、定量的 RT-PCR を用いた測定でも、スフェロイド形成から得られた癌幹細胞で強い発現がみられた。

(5)スフェロイド形成能が維持されている癌幹細胞における ADAR1 の役割

ADAR 阻害薬である EHNA 塩酸塩と pentostatin 処理を行った、親株 SAS 細胞から得られた癌幹細胞においてその細胞学的変化を検討した。その結果、両者の阻害薬で濃度依存性、時間依存性に細胞増殖が抑制されることが示された。Matrigel を用いた細胞浸潤能と細胞遊走の検討からもその能力が低下していた。親株 SAS 細胞から得られた癌幹細胞では、基質分化酵素活性をゼラチンゼンモグラフィでみたところ、ADAR 阻害薬で MMP-9 の産生低下がみられた。

(6)癌幹細胞の ADAR1 を介した細胞内シグナル伝達機構による自己複製能の制御

親株 SAS 細胞から得られた癌幹細胞について、ADAR1 のノック・ダウンによる形質変化を検討

した。その結果、ADAR1-p110 に対する siRNA を電気穿孔法で細胞導入し、導入後 48 時間でノック・ダウン効率が最大に達しているのを確認した後、癌幹細胞が発現する SOX2 と POU5F1 の発現について、スクランブル siRNA と比較し発現がいずれも低下していた。

(7) 癌幹細胞における上皮 間葉転換誘導能

親株 SAS 細胞から得られた癌幹細胞と癌幹細胞樹立前の親株 SAS 細胞に、TGF- β 処理を行い上皮 間葉転換を誘導させた結果、親株 SAS 細胞から得られた癌幹細胞は癌幹細胞樹立前の親株 SAS 細胞に比較して、間葉マーカーである Vimentin と N-Cadherin mRNA 発現の上昇を認めた。さらに、これらを制御する転写因子である Snail、Twist2 及び Slug の mRNA 発現も上昇したことから、癌幹細胞が再発・転移等の予後不良の制御を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohuchi Kentaro, Saga Ryo, Hasegawa Kazuki, Tsuruga Eichi, Hosokawa Yoichiro, Fukumoto Manabu, Okumura Kazuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA-PKcs phosphorylation specific inhibitor, NU7441, enhances the radiosensitivity of clinically relevant radioresistant oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2023.1610	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 Fukui Roman, Saga Ryo, Matsuya Yusuke, Tomita Kazuo, Kuwahara Yoshikazu, Ohuchi Kentaro, Sato Tomoaki, Okumura Kazuhiko, Date Hiroyuki, Fukumoto Manabu, Hosokawa Yoichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Tumor radioresistance caused by radiation-induced changes of stem-like cell content and sub-lethal damage repair capability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05172-4	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 Saga, R., Hasegawa, K., Murata, K., Chuiba, M., Nakamura, T., Okumura, K., Tsuruga, E., Hosokawa, Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via the suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3555-3561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.9990	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 細川陽一郎、嵯峨 涼、長谷川和輝、大内健太郎、奥村一彦	4. 巻 10
2. 論文標題 放射線治療に関わる癌幹細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 保健科学研究	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大内健太郎、細川洋一郎、奥村一彦
2. 発表標題 放射線抵抗性を獲得した口腔扁平上皮癌細胞における放射線応答変化
3. 学会等名 北海道医療大学歯学会第39回学術大会、2021年3月13日、オンライン開催
4. 発表年 2021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	細川 洋一郎 (Hosokawa Yoichiro) (70173599)	弘前大学・保健学研究科・教授 (11101)	
研究分担者	小林 美智代 (Kobayashi Michiyo) (80316265)	奥羽大学・歯学部・講師 (31602)	

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