

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19161

研究課題名（和文）EMTを介した口腔癌の浸潤機構におけるAnnexinA8の解析

研究課題名（英文）Analysis of Annexin A8 in EMT-mediated Oral Cancer Infiltration

研究代表者

石田 扶美（田中扶美）（Ishida, Fumi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：60625979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌にSnailを導入し、パーシャルEMT（pEMT）とEMTを段階的に再現する実験系を確立した。当初本計画が研究対象としたAnnexin A8は本計画で最終年度に実施したRNAseqによる解析ではSnail導入による発現変動は検出できなかった。しかし、Annexin A遺伝子ファミリーのうちAnnexin A10はpEMTで消失、EMTで発現亢進、Annexin A6はpEMTからEMTへ段階的に発現亢進、Annexin A9はpEMT,EMTで発現消失することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌にSnailを導入し、パーシャルEMT（pEMT）とEMTを段階的に再現する実験系を確立し、RNAseqにより全遺伝子の発現をトレース可能となった。膨大な遺伝子発現プロファイルを、公開データベースと統合解析することで単一遺伝子Snailの導入がpEMTにとどまり、いかにEMTへと移行するのかを突き止める足掛かりとなった。またEMTをpEMTへ逆戻りする実験系を開発できたが、核内受容体の遺伝子発現が要であることが判明し、そのリガンドが癌悪性度を制御できる可能性を発見した。

研究成果の概要（英文）：I established an experimental system to reproduce partial EMT (pEMT) and EMT in stages by introducing Snail into an oral squamous cell carcinoma cell-line. The expression of Annexin A8, which was initially the subject of research in this project, could not be detected by the analysis using RNAseq conducted in the final year of this project. However, it was found that Annexin A10 was disappeared by pEMT and was upregulated by EMT, Annexin A6 was gradually upregulated from pEMT to EMT, and Annexin A9 was upregulated by pEMT and EMT.

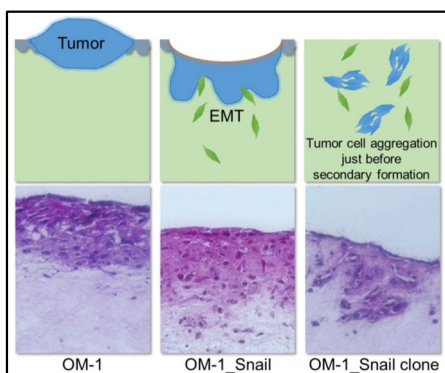
研究分野：口腔外科学

キーワード：EMT Partial EMT Snail Annexin A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らの研究グループは、2001年から口腔扁平上皮癌におけるEMT研究を開始し、癌細胞に転写因子Snailをウイルスベクターで導入して多段階EMT誘導モデルを確立した(左図)。



型扁平上皮癌細胞OM-1ゲノム上にSnail遺伝子を挿入した場合、パーシャルEMTにとどまり、EMTを完遂するためにはSlugの発現回復が必要であった。

本課題は、当初癌細胞の浸潤開始の動機を増殖のための間質からの栄養確保と想定し、癌細胞と間質との相互作用として、がん細胞由来性因子が媒介しうるアンジオジェネシスが癌浸潤のバリエーションを形成する機構と仮定し、これに関与しうる候補分子 AnnexinA8を中心に解析することを目的とした。

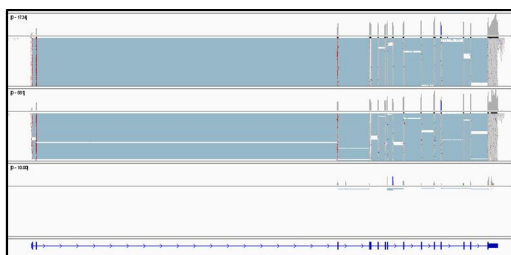
2. 研究の目的

癌細胞の形質悪性度は分化度が一つの大きな指標であり、癌細胞に対する周囲環境からの干渉と、癌細胞の周囲環境への介入によって、浸潤を含む癌の進展は修飾されることにある。この修飾にEMT誘導因子Snailが関与しているため、その媒介分子として生理的に基底細胞層に発現するAnnexinA8に注目した。OM-1細胞は、SnailによるEMTの多段階進行を再現することが可能であったため、EMT強度調節機構の解析には最適であった。本研究ではSnail誘導性多段階EMTモデルの細胞群におけるAnnexinA8分子の動態を解析し、Snail、EMTとそれぞれの浸潤様式との関連性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子転写産物は完全長だけでなくアイソフォームが存在し、ファミリー遺伝子産物の機能も多様と考えられる。Annexin A8もいくつかのアイソフォームが存在する。そこでまず次世代シーケンズであるmRNAシーケンズ法を用い、舌癌由来細胞株OM-1とSnailを導入してパーシャルEMTを誘導したOM-1Snail細胞、恒常的にE-cadherinの発現が消失しているOM-1Snail clone細胞の網羅的遺伝子発現比較解析を行った。

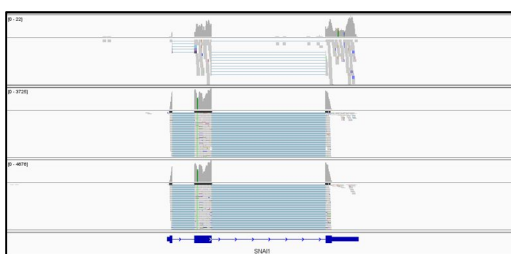
4. 研究成果



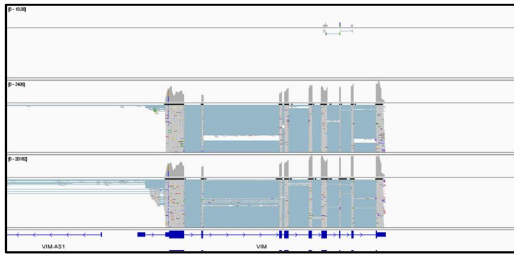
OM-1細胞、OM-1Snail細胞、OM-1Snail clone細胞よりRNAを回収し、cDNAを合成、アダプター配列を付加し遺伝子ライブラリーを調整した。ライブラリーを次世代シーケンシングにより網羅的に配列同定を行い、全リードをゲノムブラウザ上にマッピングし遺伝子発現を可視化した。

左にゲノム上、Eカドヘリン遺伝子にマッピングされたリードを示す。上から順にOM-1, OM-1Snail, OM-1Snail cloneリードを示し、最下にE

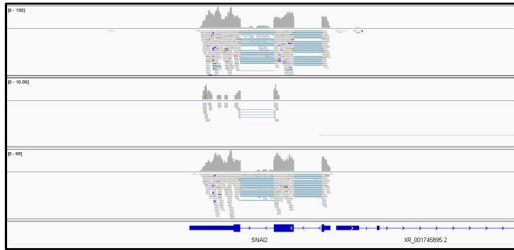
カドヘリンの遺伝子構造を示している。エクソン上にマップされたリード数はヒストグラム示されている。イントロンをまたぐリードのギャップは水色で示され、直感的に発現量を捉えることができる。



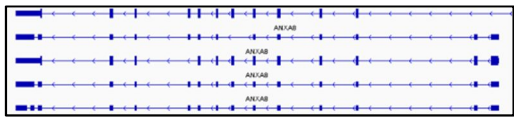
左図はOM-1Snail, OM-1Snail clone間で外来性Snailの発現に差がないことを示す。ヒストグラム下の黒バーはリード数が多いため縮小表示したことを示す。SnailのORFのみがマッピングされることから直感的にベクター導入したSnailが発現していることがわかる。



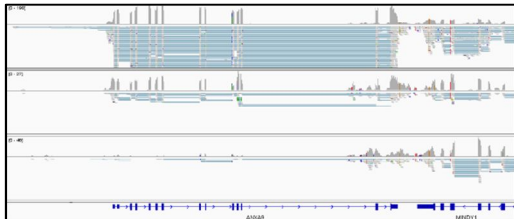
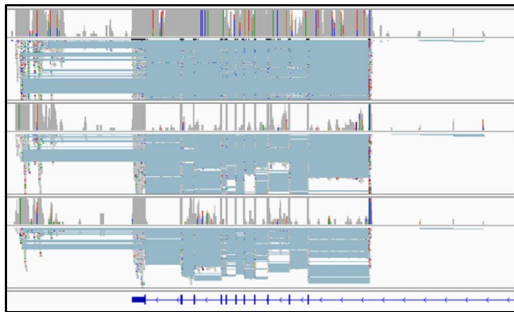
左図はビメンチン遺伝子へのリードマッピングを示す。Eカドヘリン発現がOM-1と変わらなかったOM-1Snailがビメンチン発現を示し、Eカドヘリンが消失した同Cloneと同等の発現を獲得していることがわかる。これによりOM-1はSnail導入によりパーシャルEMT形質を示し、細胞形態でセレクションしたOM-1Snail Clone細胞はEMT形質を示していることが示された。



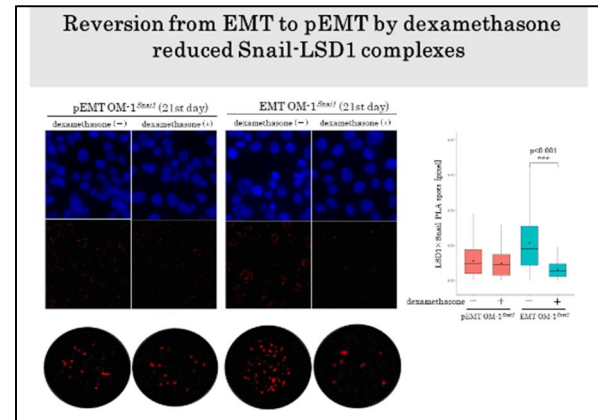
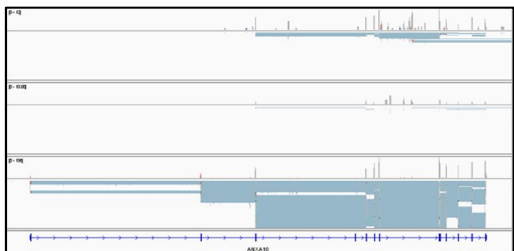
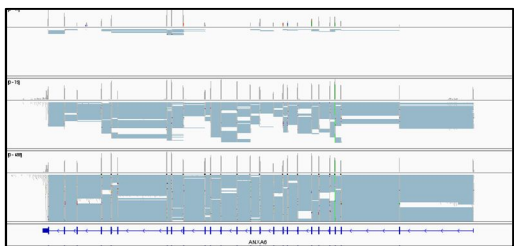
左図はSlug遺伝子へのリードマッピングを示す。パーシャルEMTを示すOM-1Snail(中段)はSlug発現が消失するが、EMT形質を持つClone(下段)はSlug発現を回復していることがわかる。以上より、過去申請者がJ Cell Biochem. 114(9):2039-49にて報告したOM-1のEMTはSnail, Slugの両者が必須であることを本研究で強固に再検証できた。



左図は当初本計画が研究対象としたAnnexinA8遺伝子構造を示す。長大なイントロン1を保有するトランスクリプト(最上)は本研究では検出されなかった。研究計画時点の予備実験ではSnail導入細胞で軽度発現上昇が認められた本遺伝子は、発現が減少(左図)していたため、実施を進めていたAnnexinA8遺伝子導入、ノックダウン細胞を用いた解析は中断した。またAnnexinA遺伝子ファミリーの発現を解析したところ左下3図(順にA9, A6, A10)に示すように、EMTのみで発現するもの、段階的に発現亢進するもの、発現消失するものが同定され、当初のAnnexinAによるアンジオジェネシスの解析これら遺伝子ファミリー各個の機能解析が必要であることが判明した。



また、本研究で用いた実験系を利用してEMTをパーシャルEMTへと逆行させることを試みた。その結果Snailがクロマチン上で形成する複合体の構成が両者の特徴付け、デキサメタゾンによるシグナルがEMTにおけるそれを、パーシャルEMTでの状態にリセットすることを発見した(下図)。



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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uetsuki Ryo, Higashikawa Koichiro, Okuda Satoshi, Yamakado Nao, Ishida Fumi, Rizqiawan Andra, Ono Shigehiro, Takechi Masaaki, Mizuta Kuniko, Shigeishi Hideo, Kamata Nobuyuki, Tobiume Kei	4. 巻 26
2. 論文標題 The squamous cell carcinoma cell line OM-1 retains both p75-dependent stratified epithelial progenitor potential and cancer stem cell properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101003 ~ 101003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101003	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 該当する

1. 著者名 Satoshi Okuda, Nao Yamakado, Koichiro Higashikawa, RyoUetsuki, Fumi Ishida, Andra Rizqiawan, Shigehiro Ono, Kuniko Mizuta, Nobuyuki Kamata, Kei Tobiume	4. 巻 30
2. 論文標題 Dexamethasone resets stable association of nuclear Snail with LSD1 concomitant with transition from EMT to partial EMT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101277 ~ 101277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101277	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 該当する

〔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 奥田哲史, 東川晃一郎, 山門奈央, 植月亮, 石田扶美, 小野重弘, 奥村俊哉, 中原和美, 島末洋, 武知正晃
2. 発表標題 EMT型口腔癌細胞におけるセツキシマブ抵抗性関連遺伝子の網羅的発現解析
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山門奈央, 東川晃一郎, 奥田哲史, 植月亮, 石田扶美, 小野重弘, 奥村俊哉, 中原和美, 島末洋, 武知正晃
2. 発表標題 EMT型口腔癌細胞における網羅的遺伝子転写産物発現解析
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
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
---------	---------