

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10139

研究課題名(和文) Snail誘導型口腔癌転移能獲得機構におけるEMTと癌幹細胞の関与の解明

研究課題名(英文) Involvement of EMT and cancer stem cells in the mechanism of Snail-induced acquisition of metastatic potential of oral cancer

研究代表者

小野 重弘(Ono, Shigehiro)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：70379882

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)：Snailが誘導すると考えられる口腔癌の高度浸潤能獲得におよぼすEMTの機構を明らかにすることを目的として本研究を遂行した。Snail導入口腔扁平上皮癌細胞株を使って、EMTに関して解析を行い、さらに幹細胞特性について検討した。その結果、SnailはEMTを介して口腔扁平上皮癌の浸潤転移能獲得に関与している可能性が示唆され、また幹細胞様形質を持つことが示唆された。一方で逆にSnailが癌幹細胞形質獲得に関与し、結果的にEMTを惹起し浸潤転移能を獲得する可能性が考えられた。以上のことから、Snailを標的として癌の浸潤・転移の制御の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の浸潤・転移機構に関して詳細は現在まで十分に解明されていない。特に、口腔癌の転移は患者の予後に大きく影響を与える。これまでにわれわれは一つの候補としてEMTを介した高度浸潤能獲得機構について研究を継続している。本研究の結果により、EMTを介した口腔癌の浸潤・転移獲得機構と幹細胞形質の獲得にSnailが関与している可能性が示唆された。本遺伝子が比較的予後の悪いとされる口腔癌の浸潤と転移を制御しうる口腔癌治療の標的になりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：We have been focusing on EMT as one of the mechanisms of cancer invasion and metastasis. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of EMT in the acquisition of high invasive potential of oral cancer, which is thought to be induced by Snail. The results suggest that Snail may be involved in the invasive and metastatic potential of oral squamous cell carcinoma via EMT and that Snail possesses stem cell-like traits. On the other hand, Snail may be involved in the acquisition of cancer stem cell traits and consequently induces EMT, resulting in the acquisition of invasive metastatic potential. These results suggest that Snail may be a potential target for the regulation of cancer invasion and metastasis.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 転移 EMT

1. 研究開始当初の背景

われわれは、「臨床的に口腔癌の浸潤・転移を抑えることを目的とした基礎的研究」という口腔癌研究における基本理念の下、研究を行っており、その中でも口腔癌の浸潤・転移機構の本質の一つとして上皮間葉移行(epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)に着目して研究を一貫して行っている。また最近では EMT を獲得した一部の癌細胞で癌幹細胞様形質があることがさまざまな癌で報告されている。われわれが臨床の現場で診断・治療している口腔扁平上皮癌においてこの EMT と癌幹細胞様形質を関連づけて詳細に述べている報告はほとんどない。口腔扁平上皮癌は頭頸部領域で最も発生率の高い癌であり、リンパ行性および血行性に転移する。その転移率は 30-40%とされており、予後は極めて不良である。また、進行癌に対し治療に成功したとしても、審美性や摂食、構音といった機能面の障害が大きくなるため、口腔扁平上皮癌の細胞の浸潤・転移のメカニズムを解明し、それらを抑制する方法を基礎的研究から解明することは極めて重要であると考えられる。

一方で、癌の再発や転移には癌幹細胞が深く関与している可能性があることが近年報告されている。癌幹細胞は「腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍組織を構成する様々な系統の癌細胞を生み出す力を併せ持つ細胞」と定義されている。癌化は正常細胞が癌幹細胞化した時点で成立し、癌幹細胞は腫瘍組織全体に生産・供給しながら増大、浸潤し、宿主を滅ぼす。また、次世代シーケンサーを用いた最近の解析で、ほとんどの腫瘍組織が複数のクローンから構成されていることが明らかとなった。この事実は、それぞれのクローンを維持し、その拡大の源となっている細胞がそのクローン特有の癌幹細胞であることとそれぞれのクローンはゲノムレベルでは均一ではあるが、少数の癌幹細胞とそこから産生された非癌幹細胞から構成されるという点で細胞生物学的に不均一な細胞群、いわゆる「癌の不均一性(Tumor Heterogeneity)」を示すことが考えられる。この「癌の不均一性」に関しては以前より着目しており、同一細胞株でも不均一性を示すことをわれわれは報告してきた以上のことから、本研究課題を遂行することにより、EMT 獲得型癌細胞が動物実験ではあるが生体内において、より異常なその癌細胞のクローンが生存競争に勝ち抜き、未分化で自己複製能をもつ癌幹細胞へと変化する過程を解明できると考える。われわれが本研究で用いる各種口腔扁平上皮癌細胞株および Snail 遺伝子導入による EMT 誘導細胞はすべて独自に樹立したものである。さらに、その独自に樹立した Snail 遺伝子導入による EMT 誘導細胞は図に示すように多段階的に浸潤様相を呈することを報告した。これら多段階浸潤様相を呈する細胞株を用いた動物実験を行うことにより、実際の臨床の現場に近い状態で癌の転移と癌幹細胞との関連性の研究が出来るものであると確信している。

2. 研究の目的

申請者らの研究グループは、口腔癌の発生・進展について長年解析を続け、特に局所浸潤における EMT の関与に関する研究を行ってきた。EMT 誘導因子である Snail に特に着目し、浸潤の多様性の形成にいかに関与しているかを探求し続けてきたこれまでの研究で口腔扁平上皮癌細胞が EMT を獲得し、高度浸潤型となるためには Snail がそのマスタージーンの一つであること可能性は明白と思われる。そこでわれわれはさらに、浸潤だけではなく、癌の転移にも大きく関与しているのではないかと考えた。一方で、高度浸潤型癌細胞の一部は癌幹細胞形質を獲得している可能性があると確認している。これらのことを踏まえて、Snail 誘導型 EMT 型癌細胞が癌幹細胞様形質を獲得し、遠隔臓器に転移をするのではないかと仮説を立て、その実験モデルとして本研究課題を設定した。Snail 誘導型の癌の転移機構を解明した場合には、本遺伝子をターゲットとした分子標的治療の有力な候補遺伝子となりうると考え、新しい癌治療の開発が期待できる。

また、現在の癌の浸潤・転移機構解析は、EMT と癌幹細胞仮説を基盤としているといっても過言ではない。われわれの研究グループは一貫して口腔扁平上皮癌の EMT 獲得機構について研究を行ってきた。特に口腔癌における Snail 誘導による EMT 獲得機構の解明に関しては、国内外でも有数であると自負している。これらは「臨床的に口腔癌の浸潤・転移を抑えることを目的とした基礎的研究」という口腔癌研究における基本理念を掲げて流行にとらわれることなく、長年継続して研究を行ってきたからであると確信する。

3. 研究の方法

本研究においては、これまでの Snail 誘導型の EMT の研究成果をさらに発展させ、以下の事項について研究を行う。

1) Snail が関与していると考えられる口腔扁平上皮癌の転移能獲得におよぼす EMT の機構の詳細を明らかにする。これまでにわれわれが研究し、解明してきた細胞運動能、基質分解酵素の発現上昇、細胞接着因子の発現低下などをさらに検討する。

2) 口腔扁平上皮癌の転移における Snail による EMT の誘導機構に対する癌幹細胞の関与を解明する。これまでのわれわれの研究結果を合わせて仮説を立てると転移形成後には可逆的な EMT 機構の存在が推定される。また、この機構には癌幹細胞が深く関与している可能性が考えられる。

そこで、本研究課題では以下の実験を分担者と共に行う。

独自に樹立した口腔扁平上皮癌細胞株および Snail を遺伝子導入して多段階的に EMT 獲得した

細胞株を用いて動物自然転移モデルを作成する。具体的には、細胞株に GFP を発現させ標識した SCC-GFP 株(仮称)を作成する。さらに SCC-GFP 株を用いて、ヌードマウスの舌および背部に様々な条件で腫瘍を接種させ、腫瘍形成させる。次に造腫瘍性の高い細胞を作成するために、最も腫瘍形成を示す条件で再度舌と背部に接種し形成された腫瘍を再度培養ディッシュ上で培養することを繰り返すことにより、100%の腫瘍形成能を持った細胞株を樹立する。さらに培養を繰り返すことにより、リンパ節転移が必発する SCC-GFP 細胞株を樹立する。この際、GFP で標識しているため、用意に転移部位を可視化することが可能である。

リンパ節転移が必発する SCC-GFP 細胞株における癌幹細胞の関与を解明する。

腫瘍形成細胞と転移必発型細胞を用いて、癌幹細胞表面マーカー (CD44, CD133, ALDH1) による FACS 解析を行い、細胞分画を行う。さらに、非接着性プレートを用いて、血清無添加培地上皮細胞成長因子(EGF)および塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のみを加えて、数週間培養してスフィアコロニーが形成されるかどうかを検討するスフィアアッセイを行う。加えて、癌幹細胞形質を確認するために、幹細胞マーカーである SOX2, OCT4, Nanog mRNA 発現を定量的 PCR 法にて確認を行う。

4. 研究成果

われわれは口腔癌の浸潤・転移機構の本質の一つとして EMT に着目して研究を一貫して行っている。また最近では EMT を獲得した一部の癌細胞で癌幹細胞様形質があることがさまざまな癌で報告されている。われわれが臨床の現場で診断・治療している口腔扁平上皮癌においてこの EMT と癌幹細胞様形質を関連づけて詳細に述べている報告はほとんどない。口腔扁平上皮癌は、予後は極めて不良である。また、進行癌に対し治療に成功したとしても、機能面の障害が大きくなるため、口腔扁平上皮癌の細胞の浸潤・転移のメカニズムを解明し、それらを抑制する方法を基礎的研究から解明することは極めて重要であると考えられる。臨床病理組織学的にびまん性浸潤様式を呈し予後不良である浸潤様式 Y-K 分類の浸潤様式 4D 型の高度浸潤型扁平上皮癌から独自に高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株を樹立した。その後、これら細胞の浸潤・転移能獲得における転写因子 Snail が誘導する EMT に関してはこれまでに詳細に報告してきた。これまでに報告してきた Snail 誘導型 EMT にいかに癌幹細胞形質が関与するかを詳細に解明することを一つの目的として実験を行った。これまで、Snail が EMT を段階的に誘導する扁平上皮癌細胞株の作成とそれらが幹細胞様特性を示す可能性があることを確認した。さらに EMT 獲得した細胞株を用いて動物自然転移モデルを作成することを試みた。具体的には、細胞株に GFP を発現させ標識した SCC-GFP 株を用いて、マウスの舌および背部に様々な条件で腫瘍を接種させ、腫瘍形成させ、最も腫瘍形成を示す条件で再度舌と背部に接種し形成された腫瘍を培養ディッシュ上で培養することにより、十分な腫瘍形成能を持った細胞株を樹立することを目的として行った。さらにその腫瘍形成能を持った細胞株における幹細胞特性について検討を行った。しかし、動物実験では舌に細胞株を接種し、腫瘍形成することはこの段階では成功に至らず、背部皮膚のみの接種での実験を行った。さらに、接種を繰り返すことにより、100%転移を来す細胞株の作成を目指したが、100%を獲得するには至らなかったが、ほぼ確実な転移を示す細胞株を用いて引き続き実験を行った。Snail 誘導型 EMT 獲得扁平上皮癌細胞株は、幹細胞マーカーである SOX2, OCT4, Nanog mRNA 発現を定量的 PCR 法を行うことにより、その発現を確認した。

以上のことから、Snail を標的とすることで癌の浸潤・転移の制御の可能性が考えられた。また、Snail の関与により、幹細胞形質を獲得することも考えられるので将来的には抗がん剤の効果予測因子にもなりうる可能性がある。今後も、Snail が誘導する口腔癌の転移能獲得と幹細胞形質獲得に関しては多方面からさらに解明を進めていく必要があると考えられた。

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 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamakado Nao, Okuda Satoshi, Tobiume Kei, Uetsuki Ryo, Ono Shigehiro, Mizuta Kuniko, Nakagawa Takayuki, Aikawa Tomonao	4. 巻 647
2. 論文標題 Chemical inhibition of LSD1 leads to epithelial to mesenchymal transition in vitro of an oral squamous cell carcinoma OM-1 cell line via release from LSD1-dependent suppression of ZEB1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 23 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.01.062	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 Okuda Satoshi, Yamakado Nao, Higashikawa Koichiro, Uetsuki Ryo, Ishida Fumi, Rizqiawan Andra, Ono Shigehiro, Mizuta Kuniko, Kamata Nobuyuki, Tobiume Kei	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山門奈央, 飛梅 圭, 奥田哲史, 植月 亮, 中川貴之, 水田邦子, 小野重弘, 相川友直
2. 発表標題 口腔癌細胞におけるデキサメタゾンによるEMTからpartial EMTへの移行
3. 学会等名 第67回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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	武知 正晃 (Takechi Masaaki) (00304535)	独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・ その他部局等・医師 (85402)	
研究分担者	飛梅 圭 (Tobiume Kei) (40350037)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	

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