

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2020～2021
 課題番号：20K23093
 研究課題名(和文) 口腔癌における原発巣 遠隔転移模倣モデルを用いた転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of metastasis mechanism using primary lesion-distant metastasis mimicry model in oral cancer

研究代表者
 筑田 洵一郎 (Chikuda, Junichiro)
 昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30882518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、原発巣形成から遠隔転移までを模倣できる同所性転移モデルと、肺転移樹立を目的とした経尾静脈モデルを樹立し、それぞれの比較解析を行うことで、同所性転移モデルに特徴的な遺伝子を明らかにすることである。舌の扁平上皮癌細胞株(SAS細胞)を用いて、まず同所性移植モデルおよび経尾静脈モデルの樹立実験を行った。SAS細胞を免疫不全マウスの舌あるいは尾静脈に移植し、移植細胞はCTにて経時的に評価した。しかし、転移巣が樹立する前に免疫不全マウスが死亡してしまい、転移モデルの樹立に難渋する結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの転移モデルの大部分は、血中移植手法や異所性の移植によって樹立されている。これらのモデルは、原発巣を離脱した癌細胞が血管に侵入するまでの過程をスキップし、浸潤-転移機構の全段階を評価するのが困難であるとされている。そこで本研究では、原発巣形成から遠隔転移まで全段階を模倣できる同所性転移モデルと、肺転移樹立を目的とした経尾静脈モデルの樹立を目指した。しかし、転移巣が形成される前にマウスが死亡してしまう結果となった。原因としてマウスの舌に癌細胞を直接移植することにより、経口摂取が困難となってしまい死亡したと考えられる。本結果を踏まえた上で、更なる条件検討を行う必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish an orthotopic metastasis model that mimics the formation of primary lesions to distant metastasis, and a tail vein model for the purpose of establishing lung metastasis. Furthermore, the purpose was to perform comparative analysis of each and clarify the genes characteristic of the orthotopic metastasis model. First, using a squamous cell carcinoma cell line of the tongue (SAS cells), SAS cells were transplanted into the tongue or tail vein of immunodeficient mice. The transplanted cells were evaluated over time by CT. However, the immunodeficient mice died before the metastatic lesions were established, resulting in difficulty in establishing a metastatic model.

研究分野：0907:口腔科学およびその関連分野

キーワード：口腔癌 癌幹細胞 micro RNA 転移 同所性移植モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な癌種において、抗癌剤耐性と造腫瘍性がともに亢進している細胞集団の存在が明らかにされ、「癌幹細胞」として定義されている。またそのような細胞集団に特異的に発現している表面マーカーも多く同定されてきた (Plaks et al. Cell Stem Cell, 2015)。頭頸部癌においては、CD44s の発現が亢進した癌幹細胞集団が存在することが既に報告されている (Prince et al. PNAS, 2007)。さらに現在では、難治性癌の本態を理解するうえで、癌幹細胞の形質獲得機構を解明することが重要な課題の1つとなりつつある。これまでに乳癌細胞株において、癌の転移に深く関与する EMT が起こり、E-cadherin の発現の低下と Fibronectin および Vimentin の発現が上昇することで、癌幹細胞集団 (CD44⁺/CD24⁻) の形成を誘導することが報告され、癌幹細胞の形質獲得機構の一端が明らかにされた (Mani et al. Cell, 2008)。また miRNA が癌幹細胞の形質である多分化能・自己複製などを維持・制御する因子であることが報告されている (Takahashi, Miyazaki et al. Front Genet, 2014)。しかしその一方で、口腔扁平上皮癌においてはその形質獲得機構の解明は未だ十分に行われておらず、口腔癌治療の領域における大きな課題の1つとなっている。

これまでに申請者らは、ヒトの舌扁平上皮癌細胞株である SAS 細胞に CD44s を遺伝子導入することで、SAS/CD44s 細胞を樹立した。親株である SAS 細胞と SAS/CD44s 細胞に対してマイクロアレイを用いて miRNA の発現量を網羅的に解析したところ、それぞれで異なった発現を示す (図 1) ことが明らかとなった (Chikuda J et al. Cancers, 2020)。さらに機能解析をした結果、miR-629-3p は 12 種類の遺伝子発現を抑制することにより、癌細胞におけるアポトーシスの抑制と細胞遊走の促進を制御することを確認した。Kaplan-Meier 法を用いた生存時間分析によると、miR-629-3p の発現量の増加は、頭頸部癌患者の生存率低下と関連する傾向にあることが示唆された。さらに、免疫不全マウスを用いた癌細胞移植実験では、miR-629-3p がシスプラチン (CDDP) 抵抗性の発現を担う (図 2) ことを発見した (Chikuda J et al. Cancers, 2020)。これらの結果は、CD44s の強制発現が miRNA の発現変動をもたらす、癌幹細胞が EMT や薬剤耐性を獲得したことが考えられる。したがって、癌幹細胞の形質である転移メカニズムにおいても同様に、miRNA/遺伝子における発現が変動し転移制御遺伝子に何らかの影響が働くのではないかと考え、本研究の着想に至った。

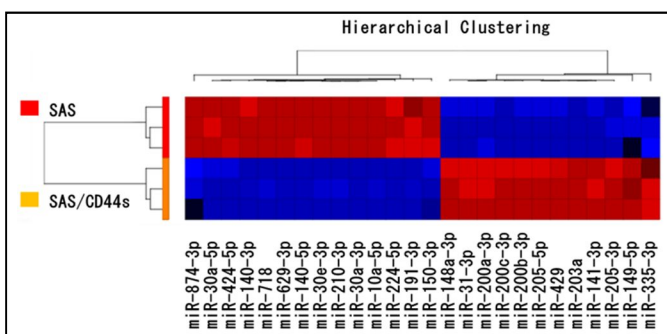


図 1 : SAS 細胞および SAS/CD44s 細胞で特異的に発現する miRNA のヒートマップ
SAS/CD44s 細胞は 14 種類の miRNA の発現量が低く、12 種類の miRNA の発現量が高い。

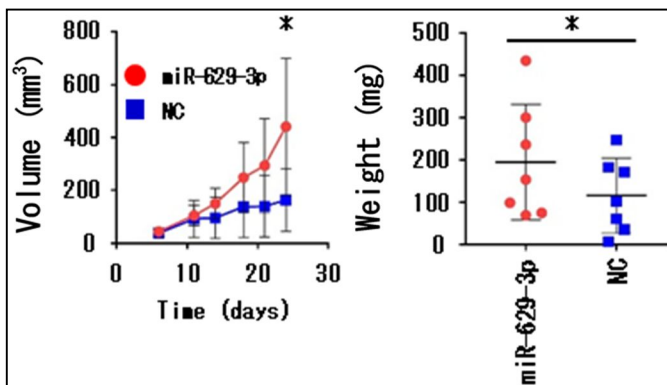


図 2 : 免疫不全マウスを用いた CDDP 耐性の検討
*in vivo*において、miR-629-3p は CDDP 耐性に関与していることが確認された。 (* P<0.05)

2. 研究の目的

これまでの転移モデルの大部分は、血中移植手法や異所性の移植によって樹立されている。これらのモデルは、原発巣を離脱した癌細胞が血管に侵入するまでの過程をスキップし、それ以降の過程を人工的に評価するための系であるため、異所性モデルは原発巣の微小環境から浸潤-転移機構の全段階を評価するのが困難であるとされている。そこで本研究では、原発巣形成から遠隔転移まで全段階を模倣できる同所性転移モデルと、肺転移樹立を目的とした経尾静脈モデルを樹立し、それぞれの比較解析を行うことで、同所性転移モデルに特徴的な遺伝子を明らかにすることが目的である。

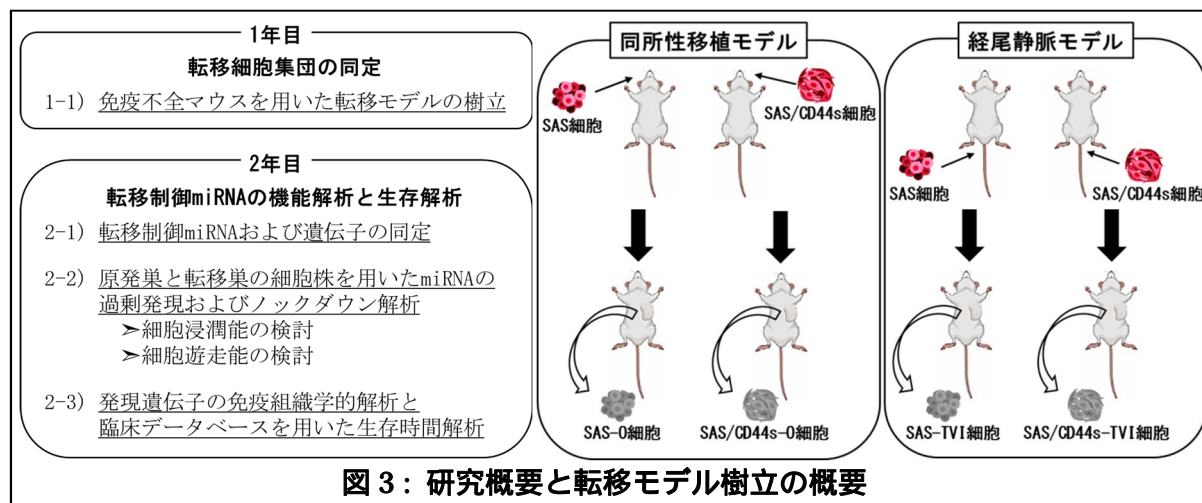
また口腔癌における癌幹細胞は、複数の splicing variant をもつ CD44 膜タンパク質を発現し、CDDP の耐性化に伴い CD44s の発現が亢進し、転移と密接な関係がある EMT 形質が誘導され

ることが報告されている(Miyazaki H et al. Oncotarget, 2018)。本研究は、SAS細胞とSAS/CD44s細胞を用いて、同所性転移・肺転移モデルを作成することで、口腔癌における新規の実験モデルを構築する。

3. 研究の方法

本研究計画では、「舌の扁平上皮癌細胞の親株(SAS細胞)と癌幹細胞のマーカであるCD44sが遺伝子導入された癌幹細胞株(SAS/CD44s細胞)における転移モデルの樹立ならびに、転移メカニズムの解明」を目的として、以下の実験項目を2か年にわたり計画した(図3)。

- 1) 口腔癌細胞株を用いた同所性移植モデルおよび経尾静脈モデルの樹立
- 2) 網羅的遺伝子発現解析による転移制御miRNAおよび遺伝子の同定
- 3) 転移制御性因子の強制発現ならびにノックダウンによる機能解析
- 4) 発現遺伝子の免疫組織学的解析と臨床データベースを用いた生存時間解析



4. 研究成果

ルシフェラーゼが導入されたSAS細胞とSAS/CD44s細胞を、免疫不全マウスの舌あるいは尾静脈に移植した。移植細胞はIVIS Imaging Systemにより経時的に評価し、原発巣・転移巣の腫瘍サイズをモニタリングした。しかし、COVID-19の影響により共同研究者との連携に難渋したため、移植細胞はCTにて経時的に評価し、原発巣・転移巣の腫瘍サイズをモニタリングした。しかし、転移巣が形成される前に免疫不全マウスが死亡してしまい、転移モデルの樹立に難渋する結果となった。原因としてマウスの舌に癌細胞を直接移植することにより、経口摂取が困難となってしまい死亡したと考えられる。本結果を踏まえた上で、更なる条件検討を行う必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------