

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09856

研究課題名（和文）死細胞貪食による口腔がん細胞活性化：脂質クオリティが果たす役割を探る

研究課題名（英文）Dead cell-mediated activation mechanisms in oral cancer: Exploring the changes in lipid quality by dead cell phagocytosis

研究代表者

山崎 学 (Yamazaki, Manabu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10547516

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）：がん細胞は正常細胞とは異なった脂質代謝を有し、がんにおける脂質クオリティ（脂質組成）理解の重要性が示されてきた。我々はこれまでに、口腔がん細胞間で生じる死細胞貪食現象が腫瘍進展に寄与する可能性を究明してきた。本研究では、がん細胞内のコレステロールが死細胞貪食により増加すること、増加したコレステロールは口腔がん細胞の極性形成と細胞遊走能を促進させ、その過程でコレステロール結合蛋白質caveolin-1の細胞膜局在を誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死細胞によって誘導される口腔扁平上皮癌の活性化機序として、貪食した死細胞に由来するコレステロールの関与が明らかとなった。本研究の成果は、死細胞貪食機序ならびにコレステロール代謝をターゲットとした新規制癌治療法の創発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells have a different lipid metabolism than normal cells, indicating the importance of understanding lipid quality (lipid composition) in cancer. We have previously investigated the possibility that the phenomenon of dead cell phagocytosis between oral cancer cells may contribute to tumor progression. In this study, we have shown that dead cell phagocytosis increases cholesterol amounts in cancer cells and that the increased cholesterol promotes polarity formation and cell migration ability of oral cancer cells, inducing plasma membrane localization of the cholesterol-binding protein caveolin-1 in the process.

研究分野：口腔病理学

キーワード：脂質 死細胞 口腔がん

1. 研究開始当初の背景

脂質はがん細胞の生存増殖に不可欠な成分のひとつである。がん細胞は正常細胞とは異なった脂質代謝を有し、近年、がんにおける脂質クオリティ(脂質組成)理解の重要性が示されている。我々はこれまでに、口腔扁平上皮癌組織におけるがん細胞間で生じる死細胞貪食現象に注目し、細胞死をきたしたがん細胞が周囲の生活がん細胞によって能動的に貪食されること、死細胞を貪食したがん細胞では細胞遊走能が活性化されることを報告してきた。

死細胞貪食の過程で、がん細胞内に貪食した死細胞由来の脂質成分が蓄積される可能性が想定されたことから、本研究では「死細胞貪食を起点としたがん細胞活性化の機序として、死細胞由来脂質によってもたらされる脂質クオリティ変化が関与する」という仮説を立て、その検証を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞における死細胞由来脂質の局在を追跡し、貪食後に生じるがん細胞の脂質組成としてコレステロールに注目した解析を通じて、細胞遊走・浸潤能に関わる分子機構との接点を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 死細胞誘導と共培養実験: 口腔扁平上皮癌由来培養細胞 (HSC-2 および HSC-3) を用いて、液体窒素および湯浴での凍結融解をおこない、細胞死を誘導した。フローサイトメトリー解析では、処理細胞の大部分は annexin V(-)/propidium iodide (+) を示し、ネクローシスの状態であった。生活細胞と死細胞との比率を 1:2 に調整して、両者を 16 時間共培養した。

(2) 死細胞由来脂質の局在検討: 培養細胞を脂質親和性蛍光色素である PKH26 であらかじめ標識した後、項目(1)の方法で細胞死を誘導し、CellTracker™ Green で標識した生活細胞と共培養した。細胞固定後に、共焦点レーザー顕微鏡にてイメージングをおこなった。

(3) 細胞内コレステロール定量: 死細胞との共培養ののち細胞を回収し、Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit を用いて、細胞内コレステロールを定量した。対照として、単独培養の生活細胞を用いた。

(4) 細胞内コレステロール除去・添加処理による細胞動態解析: 細胞内コレステロールの細胞動態に及ぼす影響を調べるために、methyl- β -cyclodextrin (M β CD) によるコレステロールの除去処理、コレステロール-M β CD 複合体によるコレステロールの添加処理をおこない、細胞形態および細胞遊走能を解析した。

(5) Caveolin-1 (CAV1) の細胞内局在と臨床病理学的因子との関連: コレステロール結合蛋白質 CAV1 の細胞内局在を蛍光抗体法および細胞分画法にて検索した。さらに、口腔扁平上皮癌外科的切除症例 63 例を対象に、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、がん細胞における CAV1 の免疫組織化学的局在と臨床病理学的因子との相関を解析した。なお、CAV1 の局在評価には、whole slide imaging のうえ、QuPath を用いて CAV1 細胞膜陽性領域を抽出した。

4. 研究成果

(1) ネクローシス死細胞貪食により細胞内コレステロールが増加する

まず、PKH26 細胞標識により蛍光色素が細胞膜へ局在することを確認した。次に死細胞と共培養した口腔がん細胞を細胞膜共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、PKH26 (赤色) で標識された死細胞は、生活がん細胞 (緑色) によって貪食されていた (図 1A, 矢印)。

口腔がん細胞は死細胞由来の細胞膜を貪食することから、貪食細胞内で細胞膜の主要構成成分であるコレステロールの増加が予想された。細胞内コレステロール定量の結果、予想通り、死細胞を貪食した細胞は対照に比べて有意に多いコレステロールを含有していた (図 1B)。

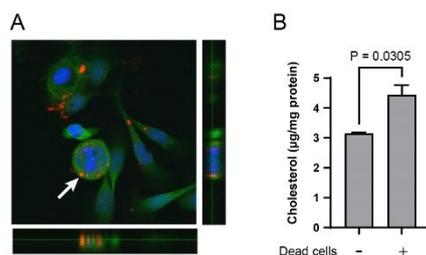


図 1 口腔がん細胞による死細胞貪食 (A) と細胞内コレステロール量 (B)

(2) 細胞内コレステロールは口腔がん細胞動態を制御する

正常細胞に比べて高い増殖能を有するがん細胞は、外部からのコレステロール取り込み能や

de novo 合成能が亢進していることが知られている。死細胞貪食により増加したコレステロールががん細胞動態を制御する可能性が想定されたため、細胞内コレステロールを変化させた際の口腔がん細胞の形態および遊走能の変化を解析した。

その結果、コレステロール除去細胞では細胞形態が円形化し、遊走能が低下した一方で、コレステロール添加細胞は葉状突起伸展により扇状の形態を示すとともに、細胞遊走能が上昇した (図2)。

これより、細胞内コレステロールが口腔がん細胞の形態および遊走能を制御する可能性が示された。

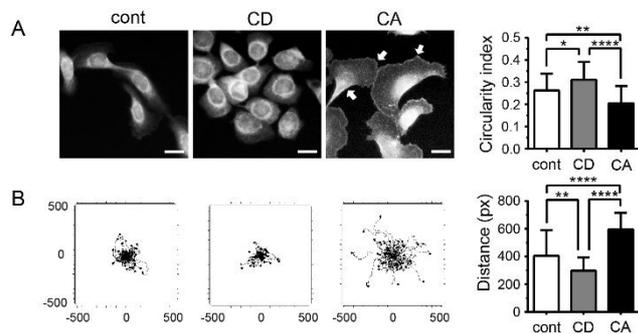


図2 細胞内コレステロール量による口腔がん細胞の動態変化
細胞形態 (A), 細胞遊走能 (B)
未処理 (cont), コレステロール除去 (CD), コレステロール添加 (CA)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (出典: 文献1, 一部改変)

(3) CAV1 細胞膜局在レベルは口腔扁平上皮癌の予後予測因子となる

CAV1 はコレステロール結合蛋白質のひとつで、口腔扁平上皮癌を含む種々のがん組織で過剰発現していることが知られている。細胞内コレステロールを除去・添加した際の CAV1 の局在を蛍光抗体法・細胞分画法で解析したところ、細胞内コレステロールが増加すると、CAV1 の細胞膜局在が亢進し、前後軸の細胞局在を誘導することがわかった。

CAV1 細胞膜局在は細胞内コレステロール量を反映するサロゲートマーカーになりうる可能性が示されたため、口腔扁平上皮癌の外科的切除検体における CAV1 の免疫組織化学的発現を検討した。口腔がん細胞での CAV1 陽性は細胞膜および細胞質内に確認されたが、局在とシグナル強度は症例間で様々であった。そこで、CAV1 細胞膜局在を定量し、細胞膜局在の少ない群 (図 3A, 上段) と多い群 (図 3B, 下段) の 2 群に分けて、無再発生存率を含む臨床病理学的因子との相関を解析した。生存解析および多変量解析の結果、CAV1 細胞膜局在レベルは無再発生存の独立予後因子であることが示された (図 3B)。

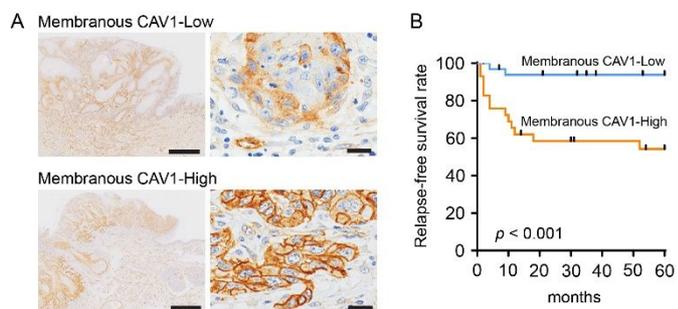


図3 Caveolin-1 (CAV1) 細胞膜局在レベルは術後再発予後因子となる
CAV1 免疫組織化学 (A), 無再発生存率 (B) (出典: 文献1, 一部改変)

(4) 実験結果の評価と研究の総括

得られた実験結果から、以下の結論に至った。

口腔がん細胞は死細胞を貪食し、死細胞由来のコレステロールを取り込む

口腔がん細胞内でのコレステロール増加は、細胞極性形成と遊走能を亢進させる

コレステロール増加による CAV1 細胞膜局在は、口腔扁平上皮癌の予後予測因子となる

本研究課題の遂行により、口腔扁平上皮癌における死細胞貪食を起点とした細胞活性化機序の一部を、脂質の一種であるコレステロールとコレステロール結合蛋白質 CAV1 の分子動態の側面から明らかにすることができ、死細胞由来コレステロールを標的化した新規治療応用への展望が開けた。なお、死細胞貪食によってもたらされるコレステロール代謝変化の詳細、コレステロール以外の脂質に関しては今後の検討課題である。

引用文献

1) Chan, N. N. et al. Cholesterol Is a Regulator of CAV1 Localization and Cell Migration in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 24, (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 山崎 学	4. 巻 53
2. 論文標題 細胞内細胞構造 “Cell-in-cell structures” の多様性と生物学的意義	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 新潟歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-4
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 無
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 Chan NN, Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Haga K, Kawaharada M, Izumi K, Kobayashi T, Tanuma JI.	4. 巻 24
2. 論文標題 Cholesterol Is a Regulator of CAV1 Localization and Cell Migration in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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） 10.3390/ijms24076035	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 Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Sumita Y, Katsumi Y, Nikkuni Y, Hayashi T, Tanuma JI.	4. 巻 15
2. 論文標題 Spindle cell squamous cell carcinoma exhibiting prominent neutrophil phagocytosis: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Report	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） 10.1186/s13256-021-03066-z	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamazaki M.
2. 発表標題 Dead tumor cells: Driving forces for progression of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 21st International Congress of Oral Pathology and Medicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 学, 阿部達也, 丸山 智, ニェイン ニェイン チャン, 河原田壮史, 田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるTLR4-NF- B経路を介した死細胞誘導性活性化
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ニェイン ニェイン チャン, 山崎 学, 丸山 智, 阿部達也, 河原田壮史, 田沼順一
2. 発表標題 コレステロールは口腔扁平上皮癌細胞の陽性を制御し遊走を促進する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ニェイン ニェイン チャン, 山崎 学, 丸山 智, 阿部達也, 河原田壮史, 田沼順一
2. 発表標題 Cholesterol promote migration of oral squamous cell carcinoma cells by regulating front-rear polarity
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 学, 阿部達也, 丸山 智, Nyein Nyein Chan, 河原田壮史, 田沼順一
2. 発表標題 死細胞によって誘導される口腔扁平上皮癌細胞の活性化機構
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 山崎 学
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における死細胞を起点とした腫瘍進展機序
3. 学会等名 第32回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会（招待講演）
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	阿部 達也 (Abe Tatsuya) (70634856)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	丸山 智 (Maruyama Satoshi) (30397161)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	
研究分担者	富原 圭 (Tomihara Kei) (70404738)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	田沼 順一 (Tanuma Jun-ichi) (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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