

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16840

研究課題名（和文）細胞競合現象に基づく上咽頭癌発癌機構の解析と、新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma based on cell competition and the development of new therapy

研究代表者

小森 岳（Komori, Takeshi）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20632524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞増殖は、周囲の正常細胞との相互作用「細胞競合」によって規定されることが報告され、この概念が10年経過してより確定的になっている。本研究では、Epstein-Barrウイルス陽性上咽頭癌前癌細胞モデルを作成し「正常細胞 vs 前癌細胞における細胞競合」現象というユニークな視点からアプローチした。細胞競合能に関わるオートファジー、NF-κB、ミトコンドリア機能異常と上咽頭癌、特にEpstein-Barrウイルス感染細胞と周囲の非感染細胞という視点を中心に解明することで、正常細胞による癌細胞制御という極めてユニークな治療法の分子基盤を解明することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Epstein-Barrウイルス陽性上咽頭癌の腫瘍発癌機序には、細胞競合現象が密接に関連していることが示された。上咽頭癌は従来の放射線化学療法により5年生存率が80%と非常に高い治療率がある。その一方、再発症例はしばしば治療に難渋し不幸な転機をたどる症例も少なくない。この細胞競合現象を利用することで、癌再発予防に有用な治療薬の可能性が本研究で示された。特に、レスベラトロールという正常細胞による癌細胞制御を促進される物質が同定され、このレスベラトロールは比較的簡便に臨床応用することが可能な薬剤でありその点からも期待される治療法が示された。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that the proliferation of cancer cells is regulated by the interaction with surrounding normal cells, known as “cell competition,” and this concept has become more definitive over the past ten years. In this study, we created a pre-cancerous cell model of EB virus-positive nasopharyngeal carcinoma and approached it from the unique perspective of “cell competition between normal cells and pre-cancerous cells.” By controlling autophagy, NF-κB, mitochondrial dysfunction, and nasopharyngeal carcinoma, particularly focusing on Epstein-Barr virus-infected cells and surrounding normal cells involved in cell competition ability, we aim to uncover the molecular basis of a highly unique treatment method of cancer cell control by normal cells.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：細胞競合 EBV タイムラプス観察

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌は Epstein-Barr ウイルス (EBV) が発癌に関与するユニークな頭頸部癌であることは有名であるが、EBV による上咽頭癌の発癌や増殖機構は未解明な点が多い。

癌細胞増殖は周囲の正常細胞との相互作用「細胞競合 (cell competition)」によって規定されることが報告されてから 10 年が経過し、この概念はより確定的になった。「細胞競合」とは、2 種類の適応能力が異なる細胞が、同時に隣接して存在する状況において、適応能力で勝る細胞 (winner) が劣る細胞 (loser) を積極的に排除する現象であり、winner の増殖と、loser の細胞死が相互依存的に起こるため、集団のサイズは一定に保たれる現象である。この現象を癌という環境で考えると、遺伝子変異を有する前癌細胞と正常細胞との間で細胞競合現象が起こり、もし前癌細胞が winner となった場合には、徐々に広範な領域で正常細胞が前癌細胞に置換されていくこととなる。すなわち癌の initiation のステップが、細胞競合によって制御されていることが示唆される。藤田らは、世界で初めて哺乳類細胞を用いて、正常細胞と癌細胞の「細胞競合」現象を報告した (Nature Cell Biol 2009)。正常細胞と Ras 癌遺伝子によって癌化させた細胞を混合培養すると、癌細胞は正常細胞層の apical 側 (管腔側) にはじき出されて排除される。排除されなかった癌細胞は正常細胞の基底層側より潜り込むようにして増殖する。申請者は、発癌の initiation のステップにおいて、「正常細胞と前癌細胞」の細胞競合において、前癌細胞が排除されずに winner となっているものと考えている。

2. 研究の目的

癌細胞増殖は周囲の正常細胞との相互作用「細胞競合」によって規定されることが報告されてから 10 年が経過し、この概念はより確定的になった (Ellis SJ et al. Nature, 2019)。そのため、新規生物学的現象のがん領域での臨床応用が期待され始めている。本研究では上咽頭癌前癌細胞モデルを作成し「正常細胞 vs 前癌細胞における細胞競合」現象というユニークな視点からアプローチする。細胞競合能に関わる、オートファジー、NF- κ B、ミトコンドリア機能異常と上咽頭癌、特に Epstein-Barr ウイルス感染細胞と周囲の非感染細胞という視点を中心に解明することで、正常細胞による癌細胞制御という極めてユニークな治療法の分子基盤を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

最初に、咽頭上皮細胞株 N69 (正常細胞モデル) を用いて、GFP-LMP1 を発現するベクターを導入し、GFP-LMP1 陽性の NP69 (前癌細胞モデル) を作製する。正常細胞モデルと、前癌細胞モデルをコラーゲン・ゲル dish で共培養することで、通常状態における winner と loser の動向を蛍光タイムラプス顕微鏡で観察する。また、同様に EBV 陰性上咽頭癌細胞株 HK1 を用いて同様の細胞モデルを作成する。

また共焦点顕微鏡を用いて、Z 軸からの観察すなわち、はじき出しによる排除や潜りこみによる増殖を観察する。共培養前後における LMP1 発現や、細胞競合マーカー分子 (Sparc, Flower 等) の発現を、ウエスタンブロットや RT-PCR で検証する。

「細胞競合」の調節因子として、炎症性サイトカインによる NF- κ B 活性化やオートファジー活性およびミトコンドリアの活性化が関与する可能性がある。

そのため、NF- κ B 調整因子 (アスピリン、COX2 阻害薬)、オートファジー調整因子 (レスベラトロール、グリセオリン、クロロキン、イベルメクチン)、ミトコンドリア活性因子 (ベザフィブラート) などを組み合わせて、細胞が winner となる条件を、蛍光タイムラプス顕微鏡を用い検討する。

また、次世代シーケンサーを用い、RNA-Seq で各転写産物のプロファイリングで転写量を解析する。一旦、NP69-LMP1-GFP と NP69-RFP を 3 日間培養後、セルソーターで細胞を分離することで各細胞群の転写産物とその転写量が解析可能である。細胞競合現象に関わる因子の生検組織における発現レベルの検討については、当教室で保存されている 110 例の上咽頭癌原発巣パラフィン包埋組織を用いる。我々の過去の検討から Sparc という分子が細胞競合現象に関わることが分かっている。この Sparc と次世代シーケンサーの検討で明らかとなった分子について免疫組織学的検討を行い、臨床的背景因子について検討を行う。

4. 研究成果

最初に、咽頭上皮細胞株 NP69 (正常細胞モデル) を用いて、GFP-LMP1 を発現するベクターをレトロウイルスベクターを用いて導入し、また同様に GFP-LMP1 陽性の NP69 (前癌細胞モデル) を作製した。正常細胞モデルと、前癌細胞モデルをコラーゲン・ゲル dish で共培養することで、通常状態における winner と loser の動向を蛍光タイムラプス顕微鏡で観察することを可能とするモデルシステムを構築した。また、緑に発色する NP69-GFP-LMP1、赤色に発色する NP69-RFP 細胞に加え、EBV 陰性上咽頭癌細胞株である HK1 に GFP で標識したリコンビナント EBV を感染させた HK1-EBV-GFP ならびに非感染細胞である HK1-RFP を樹立した。これらの細胞を使用し、共焦点

顕微鏡を用いて、Z軸からの観察すなわち、はじき出しによる排除や潜りこみによる増殖を観察した。また、タイムラプス顕微鏡を用いて最適な条件について検討を行なった。タイムラプス観察のモデルシステムの条件設定は様々な条件で行なったが、6ウェルでプレート底面に薄くコラーゲンゲルを塗布したプレートでの観察が最も観察が容易となる条件となった。プレートの観察中の歪みを避けるため、専用の培養チャンバーを使用して定常的に混合ガスおよび湿潤用の精製水を供給できるシステムを用いて96時間の連続観察システムを構築した。

また、これらの細胞を使用し、共焦点顕微鏡を用いて、Z軸からの観察すなわちはじき出しによる排除や潜りこみによる増殖を観察した。複数回同様の実験を行い、NP69Tでは、正常細胞モデルと前癌細胞モデルを1:100に混合した際に、はじき出し現象や潜り込み現象が促進される現象が統計学的に有意であることを見出した。EBV陰性癌細胞HK1では1:50に混合した際に現象がよく観察された。

さらにこの観察システム化に各種薬剤の添加によってどのような変化が見られるか解析を行った。その結果、ほとんどの薬剤による細胞競合現象の変化を認めることはなかったが、レスベラトロールの添加を行うと細胞競合現象に促進される変化がみられることを見出した。

次に、次世代シーケンサーを用い、RNA-Seqで各転写産物のプロファイリングで転写量を解析した。一旦、NP69-LMP1-GFPとNP69-RFPを3日間培養後、セルソーターで細胞を分離することで各細胞群の転写産物とその転写量が解析したところ、細胞混合状態ではSparcのmRNA発現がNP69T-RFPの方で統計学的に有意に増加する現象を認めた。

またSparc発現を上咽頭癌生検組織標本において評価し、EBV発現との関連性について解析を行い臨床的背景因子との関連性を検討した。臨床的背景因子とSparcの発現に相関性を認めることはなかったが、EBV陽性上咽頭癌では腫瘍周囲の正常組織にSparc発現が顕著になる現象を見出した。

以上より、EBV陽性上咽頭癌において、細胞競合現象は腫瘍増殖に関わる因子であることが判明し、レスベラトロールの添加によって細胞競合現象が顕著となることから、腫瘍の発生予防に有用である可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dochi H, Kondo S, Komura S, Moriyama-Kita M, Komori T, Nanbo A, Sakaguchi M, Fukuyo M, Hamabe-Horiike T, Tanaka M, Mizokami H, Kano M, Kitagawa Y, Kobayashi E, Hirai N, Ueno T, Nakanishi Y, Endo K, Sugimoto H, Hanayama R, Kaneda A, Yoshizaki T.	4. 巻 154
2. 論文標題 Peritumoral SPARC expression induced by exosomes from nasopharyngeal carcinoma infected Epstein-Barr virus: A poor prognostic marker	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 895-911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.34777	査読の有無 有
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 -

〔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
---------	---------