

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19630

研究課題名（和文）DNA損傷が司る“がんの共食い”を介した口腔がんの新たな高悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel high grade transformation mechanism in oral cancer via DNA damage driven "Cancer cannibalism"

研究代表者

常松 貴明（TSUNEMATSU, Takaaki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・准教授

研究者番号：70726752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：死細胞はマクロファージや樹状細胞などのプロフェッショナルな貪食細胞によって除去されることが知られている。一方、悪性度の高い腫瘍では、プロフェッショナルな貪食細胞ではない癌細胞が死んだ癌細胞を取り込む現象“がんの共食い”が頻りに観察される。しかし、その生物学的意義や分子メカニズムはほとんど解明されていない。そこで、我々はin vitroで死細胞の貪食を定量的に評価する実験を確立し、その制御因子を探索した。興味深いことに、DNA損傷が死細胞の貪食を促進すること、またATM-Chk1経路がこの表現型に重要であることも明らかにした。これらの結果から、“がんの共食い”の新しい分子メカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、口腔がんを含めた頭頸部扁平上皮癌の全ゲノム解析がなされたものの、分子標的治療の進む他臓器のがんと異なりドライバー変異がないことが明らかとなっており、がんの免疫回避機構を標的とした免疫チェックポイント阻害薬のようにドライバー変異とは異なる観点からのがん治療法の開発が今後益々必要となると考えられる。つまり、新しい観点からがんの生物学を切り拓く可能性を有する“がんの共食い”は高悪性度腫瘍の治療ターゲットとして新たなブレイクスルーを生み出すポテンシャルを有していると考えられる。本研究成果で得られた“がんの共食い”の分子機構の一端を基に新しい観点からのがんの理解が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is well known that dead cells are removed by professional phagocytes such as Macrophage and Dendritic cells. Whereas the engulfment of dead cancer cells by cancer cells, which can be non-professional phagocytes, is frequently observed in high grade tumors. This phenomenon is classified as a type of "Cancer cell cannibalism". However, their biological significance and molecular mechanism largely haven't been understood. Therefore, we established the quantitative in vitro experiment for evaluation of dead cells engulfment and explored for its regulators. Interestingly, we identified that DNA damage promoted dead cells engulfment. In addition, we also found that ATM-Chk1 pathway was important for this phenotype. Overall, our results suggested that the novel molecular mechanism of "Cancer cell cannibalism".

研究分野：実験病理学

キーワード：がんの共食い DNA損傷

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の身体では、炎症、感染または生理的に日々たくさんの死細胞が生じている。これらの死細胞は主にマクロファージや樹状細胞などのプロフェッショナルな貪食細胞によって貪食され、除去されることが一般に古くから知られている。特に、貪食細胞によるアポトーシス細胞の除去はエフェロサイトシスと呼ばれ、単に死細胞を除去するだけでなく、貪食することにより貪食細胞から IL-10 などの抗炎症性メディエーターが分泌され、過剰な炎症反応を抑えることが明らかとなりつつある (*Immunity* 50(5):1149-1162, 2019)。一方、がんの病理組織検体では Cell-in-cell appearance と呼ばれる非プロフェッショナルな細胞であるはずのがん細胞による死んだがん細胞の貪食像“がんの共食い”が認められる。この共食いは口腔がん、乳がんや悪性黒色腫で特徴的に認め、特に予後不良の高悪性度の組織型で高頻度に出現することが報告されている (*Nat Review Cancer* 18,758-766, 2018)。また、一般に高悪性度腫瘍では腫瘍組織の病理組織切片上で観察される細胞死の増加は悪性度の評価の指標の一つでもあり、高悪性度腫瘍においては腫瘍の増大に従って、多量の死んだがん細胞が生じることが知られている。すなわち、高悪性度腫瘍で見られる“がんの共食い”はがんの進展に深く関わる可能性を有しているものの、その生物学的意義や分子機構はほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

近年、口腔がんを含めた頭頸部扁平上皮癌の全ゲノム解析がなされたものの、分子標的治療の進む他臓器のがんと異なりドライバー変異がないことが明らかとなっており (*Nature* 517:576-582, 2015)、ドライバー変異に対する分子標的薬の創薬は困難であると考えられる。

従って、PD1/PD-L1 を代表とするがんの免疫回避機構を標的とした免疫チェックポイント阻害薬のようにドライバー変異とは異なる観点からのがん治療法の開発が今後益々必要となると考えられる。つまり、新しい観点からがんの生物学を切り拓く可能性を有する“がんの共食い”は高悪性度腫瘍の治療ターゲットとして新たなブレイクスルーを生み出すポテンシャルを有していると考えられる。さらに、“がんの共食い”は口腔がんのみならず、悪性度の高い組織型の乳がんや悪性黒色腫でも高頻度に観察されることから、様々な臓器の高悪性度腫瘍の治療にも応用できる大きな波及性を有している。

そこで、本研究では、がんの進展に深く関わる可能性を有しているものの、その生物学的意義や分子機構はほとんど明らかにされていない“がんの共食い”の分子実態を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、がん組織における“がんの共食い”の生物学的意義や分子機構を明らかにするため、研究代表者らがこれまでに確立した“がんの共食い”の *in vitro* 定量評価系を中心として解析を進めた。具体的には、まずアポトーシスを誘導したがん細胞を周囲の pH が低下すると蛍光を発する色素 (CypHer5E) で標識した。次に、この標識されたアポトーシスがん細胞を GFP で

標識した同一の viable ながん細胞を数時間、共培養した後、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性がん細胞に貪食され、ライソゾームに運ばれることで周囲の pH が低下し、蛍光を発するようになったアポトーシスがん細胞を検出した。この実験系にアポトーシスの阻害薬やアクチン重合阻害薬を併せて用いると、がん細胞の貪食がほぼ完全に抑制されたことから、がん組織の病理組織切片上で観察される“がんの共食い”を再現した実験モデルであると考えられた。

本研究計画では、“がんの共食い”の生物学的意義や分子機構の中でも研究代表者らが新たに見出した「DNA 損傷時ながん細胞の貪食能が亢進する」という現象に着目し、“がんの共食い”における DNA 損傷シグナル経路の解析を実施した。

#### 4. 研究成果

当初の研究計画に基づいて、DNA 損傷によってがん細胞による貪食が亢進した状態で活性化している DNA 損傷シグナル経路をウエスタンブロット法で検討した。その結果、DNA 損傷によって貪食が亢進した状態のがん細胞では、Checkpoint kinase 1 (Chk1)の 317 番目のセリンのリン酸化やそのファミリー分子である Chk2 の 68 番目のスレオニンのリン酸化が上昇していた。さらに、DNA 損傷のマーカーとしても用いられるヒストン H2AX の 139 番目のセリンのリン酸化が著明に上昇していた。一方で、p53 の loss を有するがん細胞をモデルとして使用しているため、DNA 損傷時に p53 によって誘導され、細胞周期を G1/S 期に停止させる Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI)として知られる p21 や p16 の発現には変動を認めなかった。

これらの結果を踏まえて、前述の“がんの共食い”の *in vitro* 定量評価系に DNA 損傷を誘導し、がん細胞による貪食を亢進させた状態に DNA 損傷シグナルに関わる分子の siRNA や阻害剤を併せて用いることで、貪食能の増減の評価を行った。具体的には、まず Chk1 及び Chk2 の上流で働くことが報告されている Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)や ATM- and Rad3-related (ATR)を両方とも阻害する薬剤である Caffeine を用いて解析を行った。その結果、Caffeine 投与は DNA 損傷による貪食能の亢進を有意に抑制した。従って、DNA 損傷によって活性化する ATM、ATR 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。

そこで、次に ATM、ATR のいずれが重要なのかを検討するため、ATM 阻害薬、ATR 阻害薬を用いて同様の実験を実施したところ、ATR 阻害薬ではなく、ATM 阻害薬で DNA 損傷による貪食能の亢進の有意な抑制が認められた。さらに、前述のウエスタンブロットの結果では、DNA 損傷によって貪食が亢進した状態のがん細胞では Chk1、Chk2 いずれも活性化していた結果に基づき、ATM の下流で働くこれらの分子のうち、どちらが重要であるかを検討するため、Chk1 阻害薬、Chk2 阻害薬を用いて同様の実験を実施した。興味深いことに、Chk2 ではなく、Chk1 阻害薬で DNA 損傷による貪食能の亢進の有意な抑制が認められた。

以上の結果より、DNA 損傷による貪食能の亢進には、ATM-Chk1 経路が中心的な役割を果たしていると考えられた。Chk1 はリン酸化酵素であり、何らかの基質タンパク質をリン酸化することで貪食能の亢進に働いている可能性が考えられることから、研究期間終了後も基質タンパク質の同定に取り組み、Chk1 によるがん細胞の貪食制御機構の詳細を解明したいと考えている。これらの研究成果は、分子病理研究会（2023 年）、口腔組織培養学会（2023 年）、日本免疫学会

(2024年)、日本病理学会(2024年)にて発表を行い、分子病理研究会では優秀発表賞に選出されるなど高く評価されている。現在、これまでの研究成果をまとめ、国際誌に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Jin Shengjian, Tsunematsu Takaaki, Horiguchi Taigo, Mouri Yasuhiro, Shao Wenhua, Miyoshi Keiko, Hagita Hiroko, Sarubo Motoharu, Fujiwara Natsumi, Qi Guangying, Ishimaru Naozumi, Kudo Yasusei	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of the OTUB1 YAP1 axis in driving malignant behaviors of head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 22156 ~ 22169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.6735	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 -

1. 著者名 Tawara Hiroaki, Tsunematsu Takaaki, Kitajima Shojiro, Nagao Ruka, Matsuzawa Shigefumi, Otsuka Kunihiro, Ushio Aya, Ishimaru Naozumi	4. 巻 706
2. 論文標題 The noncanonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149741 ~ 149741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149741	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 -

1. 著者名 Wenhua Shao, Tsunematsu Takaaki, Umeda Masaaki, Tawara Hiroaki, Fujiwara Natsumi, Mouri Yasuhiro, Arakaki Rieko, Ishimaru Naozumi, Kudo Yasusei	4. 巻 12
2. 論文標題 Cancer cell derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 8510 ~ 8525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5601	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 -

1. 著者名 Tsunematsu Takaaki, Arakaki Rieko, Sato Mami, Saito Masako, Otsuka Kunihiro, Furukawa Yusuke, Taquahashi Yuhji, Kanno Jun, Ishimaru Naozumi	4. 巻 192
2. 論文標題 Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- B Activation in Chronic Peritonitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1559 ~ 1572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2022.07.009	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 常松 貴明、俵 宏彰、佐藤 真美、福田 一稀、大塚 邦紘、牛尾 綾、石丸 直澄
2. 発表標題 DNA損傷シグナルによって誘導されるがん細胞の新たな機能とその分子機構
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 常松 貴明、石丸 直澄
2. 発表標題 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明
3. 学会等名 第40回分子病理学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 常松貴明、石丸直澄
2. 発表標題 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明
3. 学会等名 2023年度徳島大学先端酵素学研究所シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 常松貴明、俵宏彰、石丸直澄
2. 発表標題 DNA損傷シグナルによってがん細胞が獲得する新たな機能
3. 学会等名 第59回日本口腔組織培養学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takaaki Tsunematsu, Ruka Nagao, Shigefumi Matsuzawa, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Naozumi Ishimaru
2. 発表標題 The molecular mechanism of “Cancer cell cannibalism” and its significance in cancer progression
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru
2. 発表標題 Cell Cycle machinery unravels the molecular mechanism of Cancer cell cannibalism
3. 学会等名 第45回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Satoh, Kunihiro Otsuka, Naozumi Ishimaru
2. 発表標題 Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- $\kappa$ B Activation in Chronic Peritonitis
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
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	森岡 翔 (MORIOKA Sho) (60870029)	岐阜大学・高等研究院・客員教授  (13701)	

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