

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11006

研究課題名(和文) 同種アポトーシス細胞貪食によって誘導される口腔扁平上皮癌の細胞活性化機序

研究課題名(英文) Phagocytosis of apoptotic cells by oral squamous cell carcinoma cells: a possible driving force for cancer progression

研究代表者

山崎 学 (Yamazaki, Manabu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10547516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織標本でがん細胞による同種アポトーシス細胞貪食がしばしば見出されるが、本現象の生物学的意義は不明である。そこで「がん細胞は同種のアポトーシス細胞を貪食することで、自身の細胞機能を活性化する」という仮説を立て、検証した。アポトーシスを誘導した培養細胞を同種生活細胞と共培養すると、多くの生活細胞がアポトーシス細胞を細胞質内に取り込んだ。アポトーシス細胞は貪食細胞のファゴソームに局在しており、貪食はRac1阻害剤により抑制された。さらに、がん細胞の遊走浸潤能はアポトーシス細胞貪食後に亢進した。これより、同種アポトーシス細胞貪食によるがん細胞機能活性化が示され、新規治療標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic cancer cells are cleaned by macrophages and also by the neighboring cancer cells. Based on a hypothesis that apoptotic cell clearance by living carcinoma cells could contribute to cancer cell activities and tumor progression, we investigated a biological significance of this phenomenon using cultured cell lines derived from oral squamous cell carcinoma. When co-cultured with UV-induced apoptotic cells, the most of living cells engulfed apoptotic cells, and this engulfment was inhibited by Rac1 inhibitor. Electron microscopy demonstrated the engulfed cells localized within the phagosomes, with which the lysosomes seem to fuse. Furthermore, co-culture with apoptotic cells enhanced migration and invasion. These results suggested that self-clearance may upregulate cancer cell activities. Control of self-clearance in cancer would open up a new direction for therapeutic intervention.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔がん 病理学 アポトーシス 貪食

1. 研究開始当初の背景

病理診断学において、がん細胞の細胞質内に好中球など他の細胞成分が存在する現象は古くから知られており、「エンペリポレーシス」や「カニバリズム」などとも呼ばれる。研究代表者は日常の病理診断業務を通じて、口腔がん細胞が赤血球やアポトーシスに陥ったがん細胞を貪食する現象に興味を抱いたが、なぜがん細胞は他の細胞成分や同種死細胞を貪食するのか、その病理学的意義と分子メカニズムに関する研究は国内外を問わず、ほとんど手つかずの状態であった。

研究代表者は科学研究費補助金(若手B・平成23~24年度、若手B・平成25~26年度)の支援を得て、プロフェッショナル貪食細胞により分泌されるオプソニン分子 MFG-E8 が口腔扁平上皮癌(SCC)細胞においても高発現され、口腔 SCC 細胞の増殖能、アポトーシス耐性能、浸潤能を亢進させることを明らかにし、さらに同種アポトーシス死細胞の貪食を促進する可能性を示した。しかしながら、MFG-E8 による細胞機能の活性化が死細胞貪食現象を介して誘導されるのかはなお不明であった。

そこで、口腔がん細胞活性亢進のメカニズムの一つとして、「アポトーシス細胞貪食自体ががん細胞の機能活性化のトリガーとなる」可能性を究明したいと考え、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、「がん細胞によるアポトーシス細胞貪食(同種死細胞貪食)はがん細胞機能を活性化する」という仮説を検証することである。主として口腔 SCC 由来培養細胞を用いた *in vitro* 実験により、1) 死細胞貪食によるがん細胞の細胞機能への影響を明らかにし、2) その分子機序を解明することで、3) 本現象機序を応用した新規抗癌治療法開発への展望を探索する。

3. 研究の方法

(1) 口腔 SCC 外科材料を用いた同種アポトーシス細胞貪食の形態学的検証: HE 染色標本をスクリーニングし、著明な同種アポトーシス細胞貪食が認められた 10 検体を対象に、連続パラフィン切片を作製し、各種の免疫組織化学的染色および TUNEL 染色を行った。

(2) 培養細胞を用いた *in vitro* 死細胞貪食実験: 口腔 SCC 由来培養細胞株 Ca9-22, SAS を用い、UV 照射により誘導したアポトーシス細胞を生活細胞と共培養して、蛍光顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡にて形態学的に解析した。

(3) pHrodo 標識による死細胞貪食能の定量と Rac1 阻害剤添加による変化: アポトーシス

細胞貪食の定量を目的に、酸性環境で強い蛍光を発する pH 感受性蛍光色素 pHrodo でアポトーシス細胞を標識して共培養を行った。また、プロフェッショナル貪食細胞において低分子 GTP アーゼ Rac1 がアポトーシス細胞貪食に関与することが知られていたため、選択的 Rac1 阻害剤 NSC23766 を共培養系に添加し、貪食能が抑制されるか否かを検討した。

(4) 死細胞貪食による細胞機能変化の解析: アポトーシス細胞と共培養した生活細胞を回収し、トランスウェル遊走試験、マトリゲル浸潤試験に供した。

(5) 死細胞貪食後の発現プロファイル解析: アポトーシス細胞と共培養した生活がん細胞の mRNA 発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法で解析した。また、培養上清を回収し、抗体アレイ法にてサイトカイン分泌をスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) 口腔 SCC 外科材料における同種アポトーシス細胞貪食: 連続切片で HE 染色像と TUNEL 染色を比較検討したところ、TUNEL 陽性アポトーシス細胞の一部は確かに SCC 細胞の細胞質内に存在していた。ライソゾームマーカーである LAMP-1 の局在を免疫組織化学的に検討すると、細胞質内に取り込まれているアポトーシス細胞の周囲に LAMP-1 が濃縮して認められた。

(2) *in vitro* 死細胞貪食実験: アポトーシス細胞を CellTracker Green で、生活細胞を CellTracker Orange でそれぞれ標識し共培養を行った。共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、アポトーシス細胞は生活細胞の細胞質内にほぼ完全に取り込まれていた。外科材料での検討と同様に、取り込まれたアポトーシス細胞周囲に LAMP-1 の濃縮が確認された。さらに透過型電子顕微鏡で観察すると、アポトーシス細胞は生活細胞のファゴソーム内に存在することが明らかとなり(図 1)、その周囲からライソゾームの融合が認められた。

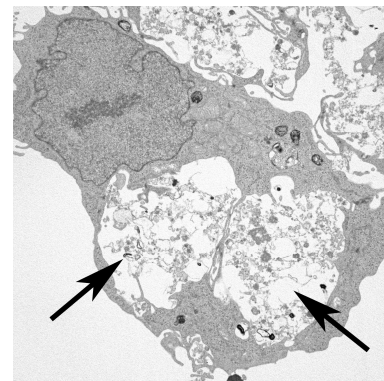


図 1 アポトーシス細胞(矢印)を貪食した生活がん細胞

(3) 死細胞貪食能の定量と Rac1 の関与: アポトーシス細胞を pHrodo で標識することにより、アポトーシス細胞貪食の定量化が可能となった。16 時間の共培養後には、Ca9-22 では 90%以上、SAS では約 50%の細胞が pHrodo 標識アポトーシス細胞を貪食した。終濃度 100 nM の NSC23766 存在下では、アポトーシス細胞貪食が著明に抑制された。活性化型 Rac1 特異抗体を用いた蛍光染色の結果、活性化型 Rac1 はアポトーシス細胞周囲に形成された phagocytic cup に局在していた。

(4) 死細胞貪食による細胞機能変化: アポトーシス細胞との共培養により生活細胞の遊走能・浸潤能が有意に亢進した。一方、この効果は共培養時に NSC23766 を添加すると消失した。

(5) 死細胞貪食後の発現プロファイル解析: Ca9-22 を用いて、単独培養系とアポトーシス細胞との共培養系、凍結融解により誘導したネクローシス細胞との共培養系の 3 群で遺伝子発現を比較した。3 群において発現変動量が大きかった上位 1000 遺伝子を抽出し、クラスタリング解析を行うと、アポトーシス細胞との共培養系は他の 2 群とは異なる発現プロファイルを示した。次にアポトーシス細胞との共培養系のみで発現が上昇した 509 遺伝子を対象に GO 解析を行ったところ、phagocytosis や phagosome assembly, cell migration などの GO が抽出された。各遺伝子の変動については引き続き解析を行っている。次に、抗体アレイ法で培養上清中のサイトカインを相対比較した結果、DKK-1 など数種のサイトカイン分泌が亢進していた。

(6) 実験結果の評価と研究の総括: これまでの結果から以下のように結論した。

口腔 SCC 細胞は同種アポトーシス細胞を積極的に貪食・消化し、この貪食機構にはプロフェッショナル貪食細胞と同様に Rac1 の活性化が関与していた。

アポトーシス細胞貪食により、口腔 SCC 細胞の遊走浸潤能が亢進した。詳細な機序は未解明であるが、いくつかのサイトカインの関与が示唆された。

本研究により、口腔がんにおける同種間アポトーシス細胞貪食に関わる分子基盤の一つが明らかとなり、貪食自体ががん細胞機能を亢進させることが示された。今後も死細胞によってもたらされる細胞機能活性化メカニズムの詳細を解明することで、本貪食現象を標的化する新規抗癌治療開発の足掛かりとしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Hashimoto K, Hayashi R, Mukaigawa T, Yamazaki M, Fujii S. Concomitant expression of ezrin and HER2 predicts distant metastasis and poor prognosis of patients with salivary gland carcinomas. *Hum Pathol.* (査読有), 63:110-119, 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2017.02.017

Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion. *Exp Mol Pathol.* 102: 327-36 *Exp Mol Pathol.* (査読有), 2017. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.018

Babkair H, Yamazaki M, Uddin MS, Maruyama S, Abé T, Essa A, Sumita Y, Ahsan MS, Swelam W, Cheng J, Saku T. Aberrant expression of the tight junction molecules claudin-1 and zonula occludens-1 mediates cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* (査読有), 57:51-60, 2016. doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.001

Essa AA, Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Raghieb AM, Megahed EM, Cheng J, Saku T. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. *Pathology* (査読有), 48:219-227, 2016. doi: 10.1016/j.pathol.2016.02.006

[学会発表](計 7 件)

山崎 学, 隅田賢正, 丸山 智, 阿部達也, 程 クン, 朔 敬. 口腔癌治療後に生じた bizarre stromal reaction の 2 例. 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年.

Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Sumita Y, Cheng J. Apoptotic cell clearance upregulates cancer cell activities in oral squamous cell carcinoma. 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2016 年.

山崎 学, 丸山 智, 阿部達也, 近藤英作, 程 クン. がん細胞による死細胞処

理：その生物学的意義。第13回日本病理学会カンファレンス，2016年。

山崎 学，丸山 智，阿部達也，バブカイール ハムザ，隅田賢正，程 クン，朔 敬。Inflammatory but not developmental histopathogenesis of intraoral lymphoepithelial cyst. 第106回日本病理学会総会，2016年。

山崎 学。口腔扁平上皮癌細胞による死細胞貪食の分子機構とその意義。第57回歯科基礎医学会学術大会・総会，2015年。

山崎 学，丸山 智，阿部達也，程 クン，朔 敬。GAS6/MERTK axis in oral squamous cell carcinoma: a possible mechanism for apoptotic cancer cell clearance by cancer cells and macrophages. 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会，2015年。

Yamazaki M. MFG-E8 expression for progression and self-clearance of apoptotic cells in oral squamous cell carcinoma. The 4th International Conference and Exhibition on Pathology, 2015年。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 学 (YAMAZAKI, Manabu)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：10547516

(2)研究分担者

阿部 達也 (ABE, Tatsuya)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：70634856

丸山 智 (MARUYAMA, Satoshi)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：30397161

程 クン (CHENG, Jun)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：40207460

朔 敬 (SAKU, Takashi)

大阪歯科大学・歯学部・客員教授
研究者番号：40145264

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし