

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11843

研究課題名（和文）細胞老化による口腔癌の抗がん剤耐性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Senescence-associated secretory phenotype is involved in cisplatin-resistant of oral cancer

研究代表者

笹部 衣里（SASABE, Eri）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：40363288

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）：DNA損傷を受けた細胞は細胞老化状態に陥り、たんぱく質やエクソソームといった生理活性物質を分泌する細胞老化関連分泌現象（SASP）を引き起こすことが知られている。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌の抗がん剤耐性獲得における細胞老化の関与を検討した。その結果、CDDP耐性株では老化様細胞が増加するとともに、耐性株の培養上清は親株のCDDP感受性を低下させた。このことより、CDDP耐性口腔扁平上皮癌細胞の多くは老化状態に陥っており、老化癌細胞からの分泌因子がCDDP耐性獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は抗がん剤治療により一旦腫瘍の縮小が認められても、その後、がん細胞が抗がん剤に対する耐性を獲得することで腫瘍の再増殖が生じることが多い。本研究では、口腔がん細胞の抗がん剤耐性獲得における細胞老化の関与について検討し、多くの耐性細胞は細胞老化状態に陥っており、いくつかのサイトカインやケモカイン、エクソソームといった因子の分泌を介して周囲の細胞にも抗がん剤耐性を誘導することが明らかとなった。このことから、将来的には、細胞老化制御薬やSASP因子を標的とした分子標的治療薬などを現行の抗がん剤治療に併用することで、口腔癌の抗がん剤治療効果を向上できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Several chemotherapeutic drugs bring advanced complications including cancer resistance by the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP) to cancer cells. However, the involvement of SASP in the chemotherapeutic efficacy in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells is poorly understood. In this study, we investigated the involvement of SASP in the susceptibility of OSCC cells to cisplatin. A cisplatin-resistant strain (SAS/CR2 cells) was established by continued exposure of OSCC cells, SAS cells, to low concentrations of cisplatin. As compared with the parent strain, the proliferative ability of SAS/CR2 cells was reduced. In SAS/CR2 cells, the ratio of SA-βgal positive cells and the expression of p21 and p53 were increased. Furthermore, the levels of SASP factors in culture supernatants were higher than those of control cells. These results suggest that SASP may be involved in cisplatin-resistant of OSCC cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：細胞老化 口腔扁平上皮癌 SASP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌においては抗がん剤治療に対して抵抗性を示すものがあり、その対応には苦慮させられる。近年、DNA損傷ストレスを受けた細胞はアポトーシスに陥るものが存在する一方で、老化状態に陥り、様々な生理活性物質（炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素、増殖因子など）を分泌するsenescence-associated secretory phenotype (SASP: 細胞老化関連分泌現象)と呼ばれる現象が生じることが明らかとなってきている¹⁾。DNA損傷ストレスを受けた細胞の老化は、本来、増殖を不可逆的に停止させ発癌を防ぐもので、その際に生じるSASPは、サイトカイン、ケモカインなどの分泌を介して免疫細胞を動員することにより、DNA損傷を受けた老化細胞を排除するための機構と考えられている^{2, 3)}。しかしながら、その一方で加齢や肥満といった生体変化により免疫系が正常に機能しない場合には、老化細胞は排除されずに生体に蓄積していき、恒常的にSASPが働くことで生じる慢性的な炎症環境が形成され、がん細胞の上皮間葉転換や悪性化が促進されることも報告されている⁴⁾。

抗がん剤治療はがん細胞とそれを取り囲む周囲の間質細胞にDNA障害を引き起こすことから、これらの細胞に細胞老化とSASPを誘導することが考えられるが、その点については明らかにされていない。さらに、抗がん剤治療は炎症性微小環境の形成と活性化、細胞の悪性形質転換などを引き起こし、抗がん剤に対する耐性を獲得させ、腫瘍の増大、転移といった更なるがんの悪性進展を促進している可能性が考えられる一方で、それとは逆に、がん細胞を排除し、炎症反応の遷延化を阻止して組織を修復する方向に働いている可能性も考えられる。従って、抗がん剤治療によってがん細胞に誘導される細胞老化とSASPは、その活性の方向性によりがんの悪性進展の促進と抑制のどちらにも作用するという二面性をもつ可能性があることから、抗がん剤耐性を克服するためには、その点を明らかにすることが必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌の抗がん剤治療効果の向上を目指して、口腔癌の抗がん剤耐性獲得における口腔扁平上皮癌細胞の細胞老化とSASPの関与を明らかにすることである。具体的には、

1. 口腔癌の抗がん剤治療過程において、どのような条件下にがん細胞に細胞老化とSASPが誘導されるのか？
2. 抗がん剤により老化に陥ったOSC細胞から分泌されるSASP因子のうち、抗がん剤感受性を制御する因子は何か？
3. 抗がん剤によりOSC細胞に誘導される細胞老化とSASPは、自身および周辺細胞にどのような影響を及ぼすのか？
を明らかにする。

3. 研究の方法

舌扁平上皮癌細胞株SASを低濃度のCDDPに持続的に曝露させることによりCDDP耐性株(SAS/CR2)を樹立し、親株と耐性株の細胞増殖能への影響(CCK-8アッセイ)、CDDPに対する感受性(colony formation assay)、CDDPによるアポトーシス誘導能(AnnexinV/PI染色によるフローサイトメトリー)を比較検討した。その後、CDDP耐性化が細胞老化に及ぼす影響を細胞形態解析、SA-β-Gal染色、DNA損傷マーカーであるγH2AXの発現にて検討するとともに、各細胞のTotal cell lysateにおけるp53およびp21^{Waf1/Cip1/Sdi1}の発現をWestern blottingにて解析した。さらに、CDDP耐性化がSASPに及ぼす影響について検討するため、各細胞の培養上清を回収し、両細胞の培養上清がSASのCDDP感受性を減弱させるかをCCK-8アッセイにて検討

するとともに、両細胞の培養上清に含まれるサイトカインの発現をプロテオームプロファイラーならびに ELISA にて比較検討を行った。これらとともに、生理活性物質の一つであるエクソソームについて、両細胞分泌エクソソームが SAS の CDDP 感受性に及ぼす影響についても検討した。

4. 研究成果

SAS/CR2 の増殖能は親株より著明に低下していた。さらに、CDDP による増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果は SAS/CR2 では親株より低下しており、SAS/CR2 の CDDP 感受性の低下が確認された。そこで、SAS/CR2 細胞は細胞老化状態に陥っているかを検討したところ、SAS/CR2 では細胞サイズの増大や扁平な形態といった老化様細胞形態を示すものが一部認められ、細胞老化マーカーの一つである SA-β-Gal 陽性細胞が出現するとともに DNA 損傷マーカーの γ H2AX の発現が亢進していた。これらに加え、細胞分裂を停止させる実行因子である p53、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} の発現が亢進していたが、もう一つの実行因子である p16^{INK4a} の発現亢進は認められなかった。次いで、SASP の影響について検討したところ、SAS/CR2 の培養上清は親株の増殖能を亢進させるとともに親株の CDDP 感受性を低下させた。さらに、SAS/CR2 細胞由来のエクソソームも培養上清と同様の効果を示した。

両細胞の培養上清を用いたプロテオームプロファイラーおよび ELISA の結果、SAS/CR2 の培養上清中には bFGF、IL-1 α などのサイトカインおよび成長因子がより多く含まれていたが、免疫細胞の遊走に関わる SASP 因子として知られる IL-1 β 、IL-6 および IL-8 のレベルは親株よりも低下していた。

以上のことより、CDDP 耐性口腔扁平上皮癌細胞は一部老化状態に陥っており、老化癌細胞から分泌されるエクソソームといった生理活性物質が周囲の細胞に CDDP 耐性を誘導している可能性が示唆された (図 1)。

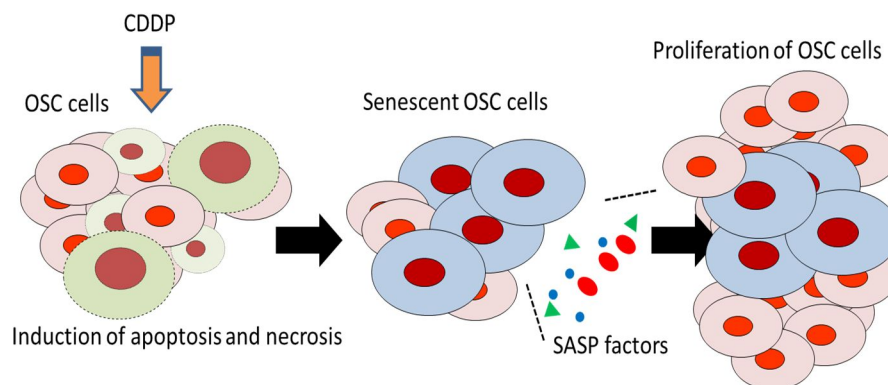


図 1 : 口腔扁平上皮癌細胞の抗がん剤耐性獲得における細胞老化と SASP の影響

引用文献

- 1) Rodier F & Campisi J : Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192: 547-556, 2011.
- 2) Serrano M, Lin AW, et al. : Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88: 593-602, 1997

- 3) Krizhanovsky V, et al. : Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479: 547-551, 2011
- 4) Shibata H, et al. : In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nat Commun*, 9: 2081, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sasabe E, Tomomura A, Tomita R, Sento S, Kitamura N, Yamamoto T.	4. 巻 e0188965
2. 論文標題 Ephrin-B2 reverse signaling regulates progression and lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0188965.	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 Kitamura N, Sasabe E, Kitaoka H, Yamamoto T.	4. 巻 56(4)
2. 論文標題 Unilateral tongue necrosis caused by cholesterol crystal embolization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 340-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bjoms.2018.03.003.	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 Sasabe E, Tomomura A, Kitamura N, Yamamoto T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Metal nanoparticles-induced activation of NLRP3 inflammasome in human oral keratinocytes is a possible mechanism of oral lichenoid lesions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicol In Vitro.	6. 最初と最後の頁 104663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tiv.2019.104663.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得における細胞老化関連分泌現象の関わり
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasabe E, Sento S, Tomita R, Yamamoto T
2. 発表標題 Senescence-associated Secretory Phenotype is involved in Cisplatin-resistant of Ora Cancer
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得における細胞老化関連分泌現象の関わり
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019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	山本 哲也 (Yamamoto Tetsuya) (00200824)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授 (16401)	
研究分担者	仙頭 慎哉 (Sento Shinya) (30635264)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	北村 直也 (Kitamura Naoya) (70351921)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	