

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463043

研究課題名(和文)新規EMT関連遺伝子MTDHが誘導する口腔扁平上皮癌の浸潤機構の解析

研究課題名(英文)The analysis of the invasion mechanism of oral squamous cell carcinoma induced by new EMT-related gene MTDH

研究代表者

小野 重弘(Ono, Shigehiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：70379882

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)：われわれが見出した遺伝子Metadherin(MTDH)が関与していると考えられる口腔扁平上皮癌の高度浸潤能獲得におよぼすEMTの機構の詳細を明らかにすることを目的として本研究を行った。これまでにわれわれが研究し、解明してきた細胞運動能、基質分解酵素の発現上昇、細胞接着因子の発現低下等をさらに詳細に検討した。その結果、MTDHは口腔扁平上皮癌細胞の高度浸潤能獲得に関与している可能性が示唆された。また、その高度浸潤能獲得に際し、同時に幹細胞様形質の獲得とも緊密に関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied for the purpose of clarifying the details of the mechanism of EMT which gave to the acquisition of high invasive ability of oral squamous cell carcinoma that Metadherin (MTDH) which we found induced. We investigated in detail a cell motility, an overexpression of the substrate degrading enzyme and a decreased expression of cell adhesion factor we have researched and examined ever. These results suggest that MTDH may relate with the acquisition of high infiltration ability of the oral squamous cell carcinoma cell. In addition, it was suggested that the acquisition of infiltration ability can relate to the acquisition of the stem cell-like form closely.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 高度浸能

1. 研究開始当初の背景

われわれは、臨床病理組織学的にびまん性浸潤様式を呈し、他のタイプに比べて転移しやすく予後不良である浸潤形式 Y-K 分類の浸潤様式 4 D 型の高度浸潤型口腔扁平上皮癌から独自に高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株を樹立した。これら細胞株は共通して間葉細胞様形態と *in vitro* における高い浸潤能を示し、細胞接着分子 E-カドヘリンの発現消失とその転写抑制因子である Snail の高発現を認めたことから EMT 型癌細胞であることを見いだした。さらに扁平上皮癌細胞株に Snail を強制発現させたところ、EMT 型癌細胞と同様の細胞生物学的形質と遺伝子発現プロファイルが再現されたことから、高度浸潤型口腔扁平上皮癌の浸潤が Snail 誘導による EMT によって制御されていることをこれまで報告してきた (Oral Oncol. 2001, Cancer Sci. 2003)。

以後、われわれが所属する研究室は、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能の獲得における EMT を介した多くの分子機構を報告し、国内・国外におけるこの分野をリードしてきた (Int J Oncol. 2003, Int J Oncol. 2006, Cancer Res. 2007, Cancer Lett. 2008, Int J Cancer. 2009)。

さらにわれわれは、これまでに EMT 型癌細胞と非 EMT 型癌細胞における microRNA の発現プロファイル解析を行った。そこで、EMT に深くかかわっていると考えられる microRNA, miR320 ファミリーを見出した。さらに miR320 ファミリーの標的遺伝子をターゲットスクリーンで検索したところ、Metadherin (MTDH) を見出した。口腔扁平上皮癌において、MTDH が EMT に関与していることを報告している論文は国内外で皆無である。また、一方で他臓器癌ではあるが、MTDH が一部の癌細胞を癌幹細胞様形質へと誘導することが報告されている (Cancer Sci. 2011, 102(6):1151-7)。高度浸潤・転移能を獲得した EMT 型癌細胞は、癌幹細胞と非常に近似した特徴を持つと考えられている。そこで、われわれは EMT と癌幹細胞の関連に関しては、約 2 年前よりロンドン大学と共同研究を進めており、EMT と癌幹細胞様形質の獲得には密接な関係があることが示唆された (Stem Cells. 2013)。

2. 研究の目的

MTDH が関与していると考えられる口腔扁平上皮癌の高度浸潤能獲得におよぼす EMT の機構の詳細を明らかにする。これまでにわれわれが研究し、解明してきた細胞運動能、基質分解酵素の発現上昇、細胞接着因子の発現低下等をさらに詳細に検討する。そして、口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における MTDH による EMT の誘導機構に対する癌幹細胞の関与を解明する。EMT は発癌過程後期における段階的な変化であると考えられ、これまでのわれわれの研究結果を合わせて仮説を

立てると、癌の浸潤先端部においては一過性の、あるいは転移形成後には可逆的な EMT 機構の存在が推定される。また、この機構には、癌幹細胞が深く関与している可能性が考えられる。

以上のことを踏まえ、われわれが見出した MTDH 遺伝子がいかに EMT や癌幹細胞様形質の獲得に関与するかを詳細に解明することを今回の研究の主目的とする。

3. 研究の方法

- ・独自に同定した EMT 関連遺伝子 Metadherin (MTDH) を介して口腔扁平上皮癌細胞株がどのように高度浸潤能を獲得するかを詳細に検討する。

- ・遺伝子導入あるいはノックダウンにより EMT を獲得した細胞の一部が癌細胞様形質をもつことを解析するために、FACS による CD44 の発現解析、自己複製能を測るスフィアアッセイを行う。

- ・MTDH 誘導型 EMT に関与する癌幹細胞を同定するために、さらに幹細胞マーカー SOX2, OCT4, Nanog mRNA の発現を確認する。

- ・癌幹細胞マーカー CD44 を用いた FACS 解析により、CD44 好発現細胞をソーティングし、ヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討する。さらに、CD44 および MTDH の発現とヒト口腔扁平上皮癌組織において免疫組織化学的に検討する。

われわれが見出した EMT 関連遺伝子 MTDH mRNA の発現と EMT 型/非 EMT 型口腔扁平上皮癌細胞の相関関係を確認する。さらにその発現細胞から MTDH mRNA を抽出し全長 cDNA を RT-PCR で増幅しシークエンスを確認後、発現ベクターに組み込む。これを MTDH の発現が消失している細胞にリポフェクション法によって遺伝子導入する。G418 などの選択マーカーを培地に添加し、耐性細胞をクローニングリングによって分離し、それぞれの細胞における導入遺伝子産物の発現を、抗体を用いたウエスタンブロットング法で確認する。

さらに、MTDH 誘導型 EMT における癌幹細胞の関与についての解析を行う。MTDH 過剰発現細胞における幹細胞マーカーの発現を確認し、EMT と幹細胞との関連性を解析する。

4. 研究成果

これまでにわれわれが研究し、解明してきた細胞運動能、基質分解酵素の発現上昇、細胞接着因子の発現低下等をさらに詳細に検討した。その結果、MTDH は口腔扁平上皮癌細胞の高度浸潤能獲得に関与している可能性が示唆された。また、その高度浸潤能獲得に際し、同時に幹細胞様形質の獲得とも緊密に関連している可能性が考えられた。

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3件)

Shigeishi H, Ohta K, Fujimoto S, Nakagawa T, Mizuta K, **Ono S**, Shimasue H, Ninomiya Y, Higashikawa K, Tada M, Ishida F, Okui G, Okumura T, Fukui A, Kubozono K, Yamamoto K, Ishida Y, Seino S, Hashikata M, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Takamoto M, Dainobu K, Tokikazu T, Nishi H, Sugiyama M, **Takechi M**. Preoperative oral health care reduces postoperative inflammation and complications in oral cancer patients. *Exp Ther Med*. 2016 Sep;12(3):1922-1928. DOI:10.3892/etm.2016.3532, 査読あり

Seino S, **Shigeishi H**, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, **Ono S**, Shimasue H, Ohta K, Sugiyama M, **Takechi M**. CD44(high) /ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β -dependent cancer stem cell properties. *J Oral Pathol Med*. 2016 Mar;45(3):180-188. DOI: 10.1111/jop.12348, 査読あり

Shigeishi H, Ohta K, Okui G, Seino S, Hashikata M, Yamamoto K, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, **Ono S**, Shimasue H, Higashikawa K, Sugiyama M, **Takechi M**. Clinicopathological analysis of salivary gland carcinomas and literature review. *Mol Clin Oncol*. 2015 Jan;3(1):202-206. DOI: 10.3892/mco.2014.441, 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

植月亮, 東川晃一郎, **重石英生**, 石田扶美, **小野重弘**, 島末洋, **武知正晃**, 口腔扁平上皮癌における幹性と EMT との関連性についての in vitro 解析, 第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016.11.25, 幕張

植月亮, 東川晃一郎, 奥井岳, 石田扶美, 山本一博, **重石英生**, **小野重弘**, **武知正晃**, 亜鉛トランスポータースイッチが口腔癌細胞の EMT 誘導機構を制御する, 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2016.4.15, 福岡

箸方美帆, **重石英生**, 清野紗矢香, 東川晃一郎, 太田耕司, **武知正晃**, CD44 high ESA low 口腔扁平上皮癌細胞における抗癌剤抵抗性とそのメカニズム

の解析, 第 25 回日本口腔内科学会学術集会, 2015.9.19, 大阪

植月亮, 東川晃一郎, 奥井岳, 石田扶美, 山本一博, 重石英生, 小野重弘, 武知正晃 Slug 発現による口腔癌の Snail 依存的 EMT 感受性の増強, 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2015.5.13, 大阪

清野紗矢香, 重石英生, 奥井岳, 箸方美帆, 植月亮, 山本一博, 小野重弘, 東川晃一郎, 太田耕司, 島末洋, 武知正晃, CD44high/ALDH1high 口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞形質の解析, 日本組織培養学会 第 88 回大会, 2015.5.27, 広島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野重弘 (ONO SHIGEHIRO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 70379882

(2) 研究分担者

重石英生 (SHIGEISHI HIDEO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 90397943

武知 正晃 (TAKECHI MASA AKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准
教授

研究者番号：00304535

飛梅 圭 (TOBIUME KEI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准
教授

研究者番号：40350037