

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K11684

研究課題名（和文）唾液腺癌幹細胞における転写因子NR4A2を介した抗癌剤抵抗性のメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of NR4A2-associated mechanism of anti-cancer drug resistance in salivary gland cancer stem cells.

研究代表者

石岡 康希 (Ishioka, Yasuki)

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：70770840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：唾液腺癌細胞を用いて、CD44high/ESALow細胞、CD44high/ESAhigh細胞、CD44low細胞をそれぞれsortingし、PGE2の5-FUにより誘導されるアポトーシスの抵抗性への関与を検討した。その結果、CD44high/ESALow細胞が産生する内因性のPGE2が、CD44high/ESAhigh細胞の5-FUにより誘導されるアポトーシスの抵抗性に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺癌における抗癌剤抵抗性のメカニズムについては十分に解明されていない。今回の研究結果から、CD44high/ESALow細胞が産生するPGE2が、CD44high/ESAhigh細胞の5-FUにより誘導されるアポトーシスの抵抗性に関与することが明らかとなった。このことから、唾液腺癌細胞における、外因性の液性因子及びNR4A2等の転写因子を介した、特徴的な抗癌剤抵抗性メカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined 5-FU-induced apoptosis in sorted cell populations (i.e., CD44high/ESALow, CD44high/ESAhigh, and CD44low cells from the salivary gland carcinoma cells) to clarify the anti-apoptotic effect of exogenous PGE2. CD44high/ESALow cells contribute to induction of resistance to 5-FU in CD44high/ESAhigh cells through provision of PGE2.

研究分野：口腔外科学

キーワード：唾液腺癌 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでに頭頸部扁平上皮癌細胞において、癌幹細胞形質を有する CD44 高発現細胞を同定した。また、口腔扁平上皮癌細胞において転写因子 NR4A2 が抗癌剤抵抗性に深く関与していることを明らかにした。しかしながら、唾液腺癌細胞における、癌幹細胞形質や抗癌剤抵抗性メカニズムについては明らかでない。

2. 研究の目的

核内オーファン受容体のなかで神経成長因子に關与する Nuclear receptor subfamily 4, group A (NR4A2)は、口腔癌組織において正常組織と比較して高発現していた (Shigeishi et al. Cancer Letters, 2011)。また、外因性の PGE2 により NR4A2 の発現が誘導されること、さらに 5-FU により誘導される口腔癌細胞のアポトーシスの抵抗性には、PGE2 による PKA シグナル経路と EGFR のリガンドである Epirigulin による EGFR の活性化が必要であることを明らかとした (Shigeishi et al. Cancer Letters, 2011)。しかしながら、唾液腺癌における抗癌剤抵抗性メカニズムについては十分に解明されていない。そのため、これまでの我々の研究成果をさらに発展させ、CD44^{high} 唾液腺癌細胞における、外因性の液性因子及び NR4A2 等の転写因子を介した、特徴的な抗癌剤抵抗性のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CD44^{high} 唾液腺癌細胞におけるアポトーシス抵抗性の検討

唾液腺癌細胞から sorting した、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞、CD44^{low} 細胞において、AnnexinV を用いて、5-FU、CDDP、Docetaxel 等により誘導されるアポトーシス細胞の検出を行う。

(2) PGE2 による NR4A2 の発現誘導の検討

NR4A2 は口腔扁平上皮癌細胞において外因性 PGE2 および EGFR からのシグナルによる制御を受け、抗癌剤抵抗性に關与することを報告した (Shigeishi et al. Cancer letters, 2011)。この結果をふまえ、唾液腺癌細胞から sorting した CD44^{high}/ESA^{low} 細胞、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞において、PGE2 存在下で培養し、転写因子 NR4A2 mRNA 発現が誘導されるかを、Real time PCR 法を用いて検討する。

さらに、PKA シグナル経路と NR4A2 発現誘導との関係を明らかにするため、PKA インヒビター存在下での NR4A2 発現の変化について検討を行う。

(3) 内因性 PGE2 の抗癌剤抵抗性に及ぼす影響の検討

CD44^{high}/ESA^{low} 細胞および CD44^{high}/ESA^{high} 細胞が産生する内因性 PGE2 を測定する。さらに、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞および CD44^{high}/ESA^{high} 細胞をトランスウェルを用いて共培養し、抗がん剤抵抗性の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) CD44^{high} 唾液腺癌細胞におけるアポトーシス抵抗性の検討

唾液腺癌細胞を用いて、FACS 解析により CD44^{high}/ESA^{low} 細胞、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞、CD44^{low} 細胞をそれぞれ sorting した。CD44^{high}/ESA^{low} 細胞、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞、CD44^{low} 細胞において、AnnexinV を用いて、5-FU により誘導されるアポトーシス細胞を検出した。その結果、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は最も高いアポトーシス抵抗性を示した。さらに、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は CDDP、Docetaxel に対して、高いアポトーシス抵抗性を示した。

(2) 転写因子 NR4A2 によるアポトーシス抵抗性への影響

CD44^{high}/ESA^{high} 細胞における NR4A2 発現を検討したところ、蛍光免疫染色にて NR4A2 は核内に発現を認めた。さらに、PGE2 添加によって CD44^{high}/ESA^{high} 細胞における NR4A2 の mRNA 発現は増加し、PKA inhibitor の添加により、NR4A2 mRNA 発現は減少した。以上の結果から、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞の NR4A2 の発現には PGE2 が関与していることが示唆された。

(3) CD44^{high} 唾液腺癌細胞における NR4A2 siRNA ノックダウンによるアポトーシス抵抗性の検討

CD44^{high} 唾液腺癌細胞では、NR4A2 siRNA ノックダウン後、5-FU により誘導されるアポトーシス細胞の割合は増加した。このことから、NR4A2 が CD44^{high} 唾液腺癌細胞のアポトーシス抵抗性に関与している可能性が示唆された。

(4) 内因性 PGE2 が 5-FU により誘導されるアポトーシスに及ぼす影響

CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は高い PGE2 産生能を示し、共培養実験の結果、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞が産生する PGE2 が、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞の 5-FU により誘導されるアポトーシスの抵抗性に関与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Snail-induced CD44^{high} cells in HNSCC with high ABC transporter capacity exhibit potent resistance to cisplatin and docetaxel. Hashikata M, Shigeishi H, Okui G, Yamamoto K, Tobiume K, Seino S, Uetsuki R, Kato H, Ishioka Y, Ono S, Ohta K, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 9(8):7908-7918, 2016.
- 2) CD44^{high}/ESALow squamous cell carcinoma cell-derived prostaglandin E2 confers resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis in CD44^{high}/ESA^{high} cells. Shigeishi H, Hashikata M, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Rahman MZ, Seino S, Ishioka Y, Ohta K, Takechi M, Sugiyama M. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 11(5):2356-2363, 2018.

[学会発表] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小野 重弘

ローマ字氏名：(ONO SHIGEHIRO)

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科 (歯)

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 70379882

研究分担者氏名：重石 英生

ローマ字氏名：(SHIGEISHI HIDEO)

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（歯）

職名：講師

研究者番号（8桁）：90397943

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。