

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11837

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるメカニカルストレスを介した癌幹細胞形質の制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanical stress-mediated control mechanism of cancer stem cell character in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

重石 英生 (Shigeishi, Hideo)

広島大学・医系科学研究科(歯)・講師

研究者番号：90397943

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)：異なる硬さのハイドロゲルおよびラミニン332にてコーティングした培養ディッシュを作成し、CD44^{high}口腔扁平上皮癌細胞を培養したところ、50kPaのハイドロゲルでは上皮細胞様形態を示したが、4.0kPaのハイドロゲルでは線維芽細胞様形態を示す細胞に変化し、1.0kPaのハイドロゲルではamoeboid様形態を示す細胞に変化した。このことから、CD44^{high}口腔扁平上皮癌細胞では、ハイドロゲルの弾性率の変化により、mesenchymal to amoeboid transitionが生じることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD44^{high}口腔扁平上皮癌細胞は、ラミニン332にてコーティングしたハイドロゲル上にて培養した結果、足場の弾性率の変化によりamoeboid様形態を示す細胞に変化することが明らかとなった。さらに、アクチン細胞骨格を制御するcofilin-1がamoeboid様細胞の形態維持に必要であることが示唆された。このことから、口腔癌幹細胞は周囲の細胞外基質や足場の弾性率に応じて、細胞形態や遺伝子発現パターンを柔軟に変化させることが可能であり、表現型および遺伝子発現の可塑性が口腔癌幹細胞の重要な特徴のひとつであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated changes in phenotype in CD44 high-oral squamous cell carcinoma cells that were cultured on laminin332-coated hydrogel with various degrees of stiffness. Mesenchymal-like morphology was observed when cells were cultured on 4.0 kPa laminin-coated hydrogel; amoeboid-like morphology was observed when cells were cultured on 1.0 kPa laminin-coated hydrogel. These results indicated that CD44^{high} cells underwent mesenchymal to amoeboid transition when cultured on laminin-coated softer hydrogel.

研究分野：Molecular Oncology

キーワード：癌幹細胞 口腔癌 ハイドロゲル 細胞外基質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、口腔癌細胞における上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) と癌幹細胞形質の関連性を検討するため、CD44 と ESA (epithelial specific antigen) をマーカーとして、口腔扁平上皮癌細胞株から、線維芽細胞形態を示す EMT 型細胞集団 (CD44^{high}/ESA^{low}) と上皮形態を示す上皮型細胞集団 (CD44^{high}/ESA^{high}) を FACS にて分離し、検討を行ってきた。その結果、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は、Vimentin や Snail などの EMT 関連遺伝子を高発現しており、高い遊走能とスフィアコロニー形成能を示すことが明らかとなった (Shigeishi et al. Stem Cells, 2013)。また、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は、数週間培養後に CD44^{high}/ESA^{high} 細胞に変化し、親細胞の表現形を再現した。このことは、同じ遺伝子型をもつ間葉系細胞が間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) により上皮系細胞を生じ、腫瘍の heterogeneity を再構成することを示す。さらに、活性化型 GSK3β は CD44^{high}/ESA^{low} 細胞の自己複製に必要であり、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は、GSK3β インヒビターを用いて CD44^{high}/ESA^{high} 細胞や CD44^{low} 細胞へ誘導されることが明らかとなった (Shigeishi et al. J Oral Pathol Med. 2015)。さらに、口腔癌細胞において転写因子である Snail を強制発現させると、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞が生じることから、Snail は EMT と CD44 発現制御の両方に関与していることが明らかとなった (Hashikata and Shigeishi et al. Int J Clin Exp Pathol, 2016)。また、ALDH1 は癌幹細胞マーカーとして知られている。我々は、CD44^{high}/ALDH1^{high} 細胞は間葉形質を示し、ALDH1 活性の維持には活性化型 GSK3β が必要であり、GSK3β のノックダウンによって、ALDH1 活性が低下し、上皮細胞様に変化することを明らかとした (Seino and Shigeishi et al. J Oral Pathol Med. 2016)。以上より、CD44^{high} 細胞において GSK3β は ALDH1 の酵素活性を制御することにより、口腔扁平上皮癌の幹細胞形質および間葉形質を制御することが明らかとなった。

2. 研究の目的

幹細胞は自己複製能と分化能をもつ細胞であるが、癌組織においても癌特異的な幹細胞が存在し、腫瘍の再発や転移に深く関与すると考えられている。我々は、CD44 高発現口腔癌細胞において間葉形質と癌細胞形質を有する細胞集団を同定し、その自己複製と分化の調節には活性化型 GSK3β 依存性の ALDH1 活性が関与していることを明らかとした。本研究においては、これまでの成果をさらに発展させ、周囲の微小環境やメカニカルストレスにより制御される、口腔扁平上皮癌幹細胞に特有な分化の調節機構を解明する。さらに癌幹細胞において制御される個々の遺伝子産物の発現を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 外因性の PGE₂ によるアポトーシス抵抗性への影響

口腔扁平上皮癌細胞において、外因性 PGE₂ および EGFR を介したシグナル制御は、抗癌剤抵抗性に関与することを報告してきた (Shigeishi et al. Cancer lett, 2011)。この結果をふまえ、液性因子である PGE₂ の存在下での、CD44^{high} 細胞の抗癌剤により誘導されるアポトーシス細胞の検出を、AnnexinV を用いた FACS 解析にて行った。GFP を遺伝子導入した CD44^{high}/ESA^{low} 細胞と CD44^{high}/ESA^{high} 細胞を同一の Dish 内で共培養し、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞において抗癌剤により誘導されるアポトーシス細胞を FACS にて解析した。さらに、セルカルチャーインサートを用いて同一のメディウム内で両細胞を共培養し、抗癌剤により誘導される CD44^{high}/ESA^{high} 細胞におけるアポトーシスを FACS にて解析した。さらに、

NR4A2 ノックダウン後の CD44^{high}/ESA^{high} 細胞におけるアポトーシス関連遺伝子発現の変化を解析した。

(2) 足場の弾性率や物性が CD44^{high} 細胞の幹細胞形質に及ぼす影響

異なる硬さ(弾性率)のハイドロゲルでコーティングした培養ディッシュにラミニン等の細胞外基質を加えた足場を作成した。異なる足場の弾性率や細胞外基質での CD44^{high} 細胞の形態の変化および幹細胞マーカーの発現を検討し,幹性の維持に適した細胞外基質を明らかにすることを目的とした。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌の癌幹細胞形質に関与する液性因子の検討

口腔扁平上皮癌細胞から CD44^{high}/ESA^{high} 細胞および CD44^{high}/ESA^{low} 細胞を sorting し,内因性 PGE2 のアポトーシス抵抗性への関与について検討した。GFP を遺伝子導入した CD44^{high}/ESA^{low} 細胞と CD44^{high}/ESA^{high} 細胞を同一の Dish 内で共培養し,CD44^{high}/ESA^{high} 細胞において 5-FU により誘導されるアポトーシス細胞の割合を FACS にて解析した。その結果,単独培養した CD44^{high}/ESA^{high} 細胞と比べて,CD44^{high}/ESA^{low} 細胞と共培養した CD44^{high}/ESA^{high} 細胞の方が,有意にアポトーシス細胞の割合は減少した。さらに,セルカルチャーインサートを用いて同一のメディウム内で両細胞を共培養し,5-FU により誘導される CD44^{high}/ESA^{high} 細胞におけるアポトーシス細胞の割合を FACS にて解析した。その結果,CD44^{high}/ESA^{low} 細胞と共培養した CD44^{high}/ESA^{high} 細胞では,有意にアポトーシス細胞の割合は減少した。さらに,ELISA 法を用いて,CD44^{high}/ESA^{low} 細胞由来の PGE2 を確認した。さらに,5-FU および PGE2 存在下での, NR4A2 siRNA ノックダウン後の CD44^{high}/ESA^{high} 細胞におけるアポトーシス関連遺伝子発現を検討したところ, Bcl2 mRNA 発現は NR4A2 ノックダウン後に減少し, Bax mRNA 発現は NR4A2 ノックダウン後に増加した。このことから, PGE2 により誘導される NR4A2 がアポトーシス抵抗性に関与することが明らかとなった。以上より, CD44^{high}/ESA^{low} 細胞由来の PGE2 が CD44^{high}/ESA^{high} 細胞の抗癌剤抵抗性に関与する可能性が示唆された(Shigeishi H et al. Int J Clin Exp Pathol, 2018)。

(2) 足場の弾性率や細胞外基質が CD44^{high} 口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響

異なる硬さのハイドロゲルおよびラミニン 332 にてコーティングした培養ディッシュを作成し,CD44^{high} 口腔扁平上皮癌細胞を培養したところ,50kPa のハイドロゲルでは上皮細胞様形態を示したが,4.0kPa のハイドロゲルでは線維芽細胞様形態を示す細胞(mesenchymal-like CD44^{high} 細胞)に変化し,1.0kPa のハイドロゲルでは amoeboid 様形態を示す細胞(amoeboid-like CD44^{high} 細胞)に変化した。このことから,CD44^{high} 口腔扁平上皮癌細胞は,ラミニン 332 をコーティングしたハイドロゲル上で培養すると,足場の弾性率の変化により,mesenchymal to amoeboid transition が生じることが明らかとなった。microarray 解析の結果より,amoeboid-like CD44^{high} 細胞では mesenchymal-like CD44^{high} 細胞と比較して cofilin-1 が高発現しており,アクチン細胞骨格を制御する cofilin-1 が amoeboid-like 細胞の形態維持に必要であることが示唆された(Shigeishi et al. Int J Clin Exp Pathol, 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 4)Shigeishi H, Yokoyama S, Murodumi H, Sakuma M, Kato H, Higashikawa K, Takechi M, Ohta K, Sugiyama M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hydrogel stiffness on morphology and gene expression pattern of CD44high oral squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 2826-2836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Takechi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 High HPV16 E6 viral load in the oral cavity is associated with an increased number of bacteria: A preliminary study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shigeishi H, Hashikata M, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, Rahman MZ, Seino S, Ishioka Y, Ohta K, Takechi M, Sugiyama M	4. 巻 11
2. 論文標題 CD44high/ESAlow squamous cell carcinoma cell-derived prostaglandin E2 confers resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis in CD44high/ESAhigh cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 2356-2363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shigeishi H, Yokoyama S, Ohta K, Takechi M, Sugiyama M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA copy number in oral rinse samples from oral cavity cancer patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Research in Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M.	4. 巻 86
2. 論文標題 Candida albicans -Glucan-Containing Particles Increase H0-1 Expression in Oral Keratinocytes via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Immun	6. 最初と最後の頁 e00575-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 重石英生, 杉山 勝	4. 巻 67
2. 論文標題 Human Papillomavirus (HPV) 感染と口腔癌の関係について 最近の研究から (総説)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 口腔衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 149-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ohta K, Naruse T, Kato H, Ishida Y, Nakagawa T, Ono S, Shigeishi H, Takechi M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Differential regulation by IFN on TNF induced chemokine expression in synovial fibroblasts from temporomandibular joint.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 6850-6857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ohta K, Naruse T, Ishida Y, Shigeishi H, Nakagawa T, Fukui A, Nishi H, Sasaki K, Ogawa I, Takechi M.	4. 巻 23
2. 論文標題 TNF- induced IL-6 and MMP-9 expression in immortalized ameloblastoma cell line established by hTERT.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Dis	6. 最初と最後の頁 199-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重石 英生
2. 発表標題 Human Papillomavirus (HPV)と口腔癌の関係について - 最近の研究から - 指定ワークショップ. 口腔癌検診とがん予防対策 口腔癌の罹患率・死亡率低減のための方策
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重石 英生, 杉山 勝, 太田 耕司, 東川 晃一郎, 武知 正晃
2. 発表標題 口腔のHPV感染の危険因子およびHPV陽性口腔癌の臨床病理学的特徴 - 最近の研究から -
3. 学会等名 第62 回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sho Yokoyama, Hideo Shigeishi, Hiroshi Murozumi, Miyuki Sakuma, Hiroki Kato, Kouji Ohta, Masaru Sugiyama, Masaaki Takechi
2. 発表標題 The effect of hydrogel stiffness on morphology and gene expression pattern in CD44high oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 第52回広島大学歯学会総会
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	太田 耕司	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授	
	(Kouji Ohta)		
	(20335681)	(15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小野 重弘 (Shigehiro Ono) (70379882)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	