

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K18302

研究課題名(和文) 正常上皮が分泌する「液性抗癌因子」は「細胞競合」と連携して癌防御を行うのか？

研究課題名(英文) Does "humoral anticancer factor" secreted by normal epithelium cooperate with "cell competition" for cancer protection?

研究代表者

北河 憲雄 (Kitagawa, Norio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40628517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌はそれを取り囲む同種の正常上皮細胞により、免疫系細胞を介さずに物理的に排除されることが報告されている。一方、癌に接触しない、正常上皮細胞も液性因子により癌排除に貢献していると推測されるが、不明点が多い。そこで、液性因子モデルnisinの作用を解析した。その結果、nisinは上皮細胞に大きな球状構造を誘導し、この球状構造は細胞骨格の蛋白質であるアクチン、ケラチンに包まれており、直径は1 $\mu$ mを超えていた。また、nisinは大きな球状構造(Macropinocytosis様構造)を誘導しない条件でも、ケラチンと細胞間結合タンパク質の複合体形成阻害など、細胞膜に作用していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Macropinocytosisはアクチンとの関係が着目されることが多く、ケラチン(K)5、K17がMacropinocytosis様構造を包む報告は今までになく新規性がある。Macropinocytosisは癌細胞の代謝において重要な役割を果たすことが知られている。また、微小環境での癌細胞の生存に関係することから、癌の悪性度とも関連すると考えられており、微小環境でのMacropinocytosis様反応についてさらに解析していく必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that normal epithelial cells sense and actively eliminate neighboring cancer cells using physical forces without the help of immune cells. Although humoral anticancer factors seem to contribute to this elimination, there is a dearth of knowledge on the topic. Thus, we analyzed the effect of nisin, a humoral anticancer factor, on epithelial cells. Nisin treatment altered keratin (K)5 and K17 distribution in the cells, making them spherical, along with actin incorporation. Since the spherical distribution was  $>1\ \mu\text{m}$  in diameter, the possibility of a macropinocytosis-like phenomenon was indicated. Nisin was effective under experimental conditions wherein micropinosome-like structures were not observed. Nisin administration induced derangement of the cell membrane, such as flip-flop, and disruption of the transmembrane structure of the keratins and desmosome protein.

研究分野：解剖学

キーワード：細胞競合 EDAC Macropinocytosis ケラチン5 ケラチン17 抗菌ペプチド 癌 ケラチノサイト

## 1. 研究開始当初の背景

細胞競合は性質の異なる同種細胞間での生存競争であり、上皮細胞では勝者の正常細胞が敗者の変異細胞(癌細胞)を免疫系の細胞を介さずに排除する(epithelial defense against cancer: EDAC)現象が知られている(1)。EDACでは、正常細胞に接している同種の癌細胞の物理的排除について、近年多くの解明がされている。その一方、抗菌ペプチド(2)や exosome 中の miRNA をはじめとする液性の抗癌因子については、物理的排除とともに EDAC に貢献していると考えられるが、まだその主体となる因子が何かについても、液性の抗癌因子の役割や作用機序についてもほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

液性抗癌因子の上皮細胞への作用、形態変化を解析することにより、EDAC を含む同種の細胞由来癌細胞に対する正常細胞による排除機序について明らかにすることを目的とする。液性抗癌因子の候補の1つである抗菌ペプチドの細胞への作用に関する研究は複数存在する。しかし、細胞の形態学的変化に関する研究は少ないため、今回解析を行った。申請者は先行研究で共焦点顕微鏡を用いて nisin が HaCaT にリング状のケラチン(K)5、17の分布を誘導することを報告しており、このリング状の分布の解明から本研究を開始した(3)。

## 3. 研究の方法

抗菌ペプチドの1つ Defensin は癌・正常上皮細胞、双方で分泌されており、過去の報告からも生存競争に関与していることが推測される(2)。しかしながら、defensin は安定性が悪いことが知られている。そこで本研究では *Lactococcus lactis* 由来の抗菌ペプチド nisin を用い、ケラチノサイト由来の細胞である HaCaT 細胞への作用を解析した(4)。

形態観察は、微細構造を観察できる手法の中では、細胞構造を保持できる超解像顕微鏡観察法を第一選択として行った。超解像顕微鏡は高細胞密度の画像取得に適していないため、超解像顕微鏡観察時は Low cell density ( $4.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) で、それ以外の時は  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、2日間培養後 nisin 処理を30分間、もしくは24時間行った。

低カルシウム培地での解析には、継代ごとに、カルシウム濃度を少しずつ低下させ、低カルシウム濃度に馴化させた細胞を用いた。細胞遊走の解析はシリコン製のカルチャーインサートに細胞を播種することで行った。カルチャーインサート除去後のギャップへ遊走した細胞を解析した。

免疫蛍光染色は、固定、透膜処理、ブロッキング後、1時間室温で一次抗体反応、30分間二次抗体反応をさせることで行った。二次抗体反応後の細胞は DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) を含む封入材で封入した。画像は LSM710 confocal laserscanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)、N-SIM super-resolution structured illumination system (Nikon, Tokyo, Japan) で取得した。

ケラチン(K)5 もしくは K17 とデスモグレイン 3 (DSG)、アクチンと E カドヘリンの共局在は近接ライゲーションアッセイにて検出した。画像は imageJ ソフトウェア及びそのプラグイン Trainable Weka Segmentation ([https://imagej.net/Trainable\\_Segmentation](https://imagej.net/Trainable_Segmentation)) を用いて解析した。細胞膜脂質の Flipflop は、annexin V により細胞表面のフォスファチジルセリンを検出することにより確認した。

3次元での nisin の細胞への作用は、丸底マイクロウェルプレートに細胞を播種して、細胞塊形成への nisin の影響を見ることで行った。

有意差は Mann-Whitney U test にて判定した。解析には IBM SPSS Statistics 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を用いた。

## 4. 研究成果

Nisin によるケラチン(K)5、K17のリング状の分布の乱れがどのような現象を示しているのか、リング状の分布の乱れが生じない場合は nisin がケラチノサイトに作用していないのかの2点を明らかにした。

超解像顕微鏡を用いた解析により、nisin による作用でケラチノサイトにはリング状というよりも、球状の構造が観察されることが分かった。K5、K17だけでなくアクチンもこの球状構造を

構成していた。また、この球状構造は低温下、低カルシウム培地培養などのエンドサイトーシス抑制条件下では観察されなかった。直径が 1 $\mu$ m を越えること、Macropinocytosis 阻害条件下（アクチン重合阻害剤、細胞遊走）では観察されなかったことから、Macropinocytosis 様の反応が起きている可能性が示唆された。

Nisin 作用条件下で、この Macropinocytosis 様反応と類似した、ケラチノサイトの LampII の核・核周囲から細胞質への分布変化が観察され、nisin により Lysosome などの小胞の分布に変化が生じている可能性が考えられた。

Nisin 作用時は細胞辺縁の均一な太さの E カドヘリン分布が乱れ、細い波状の線状分布を示した。一部に他の E カドヘリン分布と直角な線状の分布も観察され、Macropinocytosis における波状分布等との関連が示唆された。

また、Macropinocytosis 様の構造が観察されない短時間の nisin 作用条件でも、細胞膜の flip-flop、有意なデスモゾーム・中間径フィラメント複合体の減少が観察され、nisin が作用していることが明らかになった。さらに nisin により細胞塊形成の阻害が確認されたことから、平面培養だけでなく、3次元培養でも nisin がケラチノサイトに作用することが明らかになった。Macropinocytosis は癌細胞の代謝において重要な役割を果たすことが知られている。また、微小環境での癌細胞の生存に関係することから、癌の悪性度とも関連すると考えられており、微小環境での Macropinocytosis 様反応についてさらに解析していく必要性が示唆された

## 引用文献

1. Kajita M, Fujita Y. EDAC: Epithelial defence against cancer-cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals. *J Biochem (Tokyo)*. 2015 Jul 1;158(1):15-23.
2. Sawaki K, Yamaai T, Mizukawa N, Yoshimoto T, Ueno T, Nakano M, et al. Mortality of human epidermal keratinocytes in co-culture with oral squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2003 Jan 1;23(1A):79-84.
3. Kitagawa N, Otani T, Inai T. Nisin, a food preservative produced by *Lactococcus lactis*, affects the localization pattern of intermediate filament protein in HaCaT cells. *Anat Sci Int*. 2019 Mar;94(2):163-71.
4. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):761-71.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Norio Kitagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Antimicrobial peptide nisin induces spherical distribution of macropinocytosis-like cytokeratin 5 and cytokeratin 17 following immediate derangement of the cell membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anatomy & cell biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5115/acb.21.168	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 Abe Tatsuya, Kitagawa Norio, Yoshimoto Shohei, Maruyama Satoshi, Yamazaki Manabu, Inai Tetsuichiro, Hashimoto Shuichi, Saku Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Keratin 17-positive Civatte bodies in oral lichen planus distribution variety, diagnostic significance and histopathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71496-8	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 Miyazono Shoji, Otani Takahito, Ogata Kayoko, Kitagawa Norio, Iida Hiroshi, Inai Yuko, Matsuura Takashi, Inai Tetsuichiro	4. 巻 153
2. 論文標題 The reduced susceptibility of mouse keratinocytes to retinoic acid may be involved in the keratinization of oral and esophageal mucosal epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 225 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-020-01845-1	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 Kitagawa Norio, Otani Takahito, Inai Tetsuichiro	4. 巻 94
2. 論文標題 Nisin, a food preservative produced by Lactococcus lactis, affects the localization pattern of intermediate filament protein in HaCaT cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 163 ~ 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-018-0462-x	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 Ozaki Akane, Otani Takahito, Kitagawa Norio, Ogata Kayoko, Iida Hiroshi, Kojima Hiroshi, Inai Tetsuichiro	4. 巻 151
2. 論文標題 Serum affects keratinization and tight junctions in three-dimensional cultures of the mouse keratinocyte cell line COCA through retinoic acid receptor-mediated signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 315 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-018-1741-2	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 北河憲雄
2. 発表標題 細胞底面に着目した癌細胞排除機構の研究
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北河 憲雄、大谷 崇仁、緒方 佳代子、稲井 哲一朗
2. 発表標題 ケラチノサイトに対する抗菌ペプチドの作用
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kitagawa N, Otani T, Ogata K, Inai T
2. 発表標題 Effect of antimicrobial peptide Nisin on keratinocytes
3. 学会等名 Asia Pacific International Congress of Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nikaido M, Otani T, Kitagawa N, Iida H, Anan H, Inai T
2. 発表標題 Stress activated mitogen-activated protein kinases affect tight junctions in K38 mouse keratinocyte cells
3. 学会等名 20th KACD-JSCD Joint Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 稲井哲一朗
2. 発表標題 ケラチノサイト液性因子による癌細胞排除の研究
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎茜, 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 瀬尾皓, 小島寛, 稲井哲一朗
2. 発表標題 血清がケラチノサイトの角化, 分化およびタイト結合に及ぼす影響についての解析
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二階堂美咲, 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 瀬尾皓, 阿南壽, 稲井哲一朗
2. 発表標題 ストレス応答MAPキナーゼの活性化によるケラチノサイトのタイト結合についての解析
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 稲井哲一朗
2. 発表標題 ケラチノサイト細胞塊形成に対する 抗菌ペプチド Nisin の作用
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎茜、北河憲雄、大谷崇仁、小島寛、稲井哲一朗
2. 発表標題 Three dimensional culture system of mouse keratinocytes
3. 学会等名 第73回 日本解剖学会 九州支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北河憲雄、大谷崇仁、稲井哲一朗
2. 発表標題 Effect of antimicrobial peptide Nisin on keratinocytes
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap  
<https://researchmap.jp/Barriology/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------