

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02973

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞におけるオルガネラストレス応答の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of organelle stress response in oral cancer stem cells

研究代表者

西頭 英起 (Nishitoh, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：根治を妨げるがんの高度悪性化をもたらす要因の一つとして、がん幹細胞仮説がある。がん幹細胞のメカニズム解明は、次世代の分子標的治療薬開発に繋がると期待される。本研究では、幹細胞の増殖と分化へのオルガネラストレス応答の役割を解明し、さらに、その制御によりがん幹細胞を低浸潤性、低転移性がんへと分化させることを目指した。その結果、幹細胞におけるオルガネラストレス応答シグナルの関与を検討し、幹細胞の増殖と分化への小胞体品質管理の重要性が明らかとなった。本研究成果は、がん治療の新たな分子標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の生存と不均質性獲得に関連性が高いといわれる、小胞体やミトコンドリアから発信されるストレス応答は、がん幹細胞の維持と悪性化にどのように関与するか全く不明であった。このことについて明らかにすることを目的とした本研究は、申請者らが有するこれまでのオルガネラ研究から得られた知見と実験技術に基づいたものであり、その独自性と目的達成の可能性は高く、そこから得られる成果は、将来の口腔がん根治に向けた応用研究へと創造性が高いと期待された。今後は、がん治療の新たな治療戦略、および分子マーカーとして応用研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The cancer stem cell hypothesis is one of the factors that lead to highly malignant transformation of cancer that prevents its cure. Elucidation of the mechanisms of cancer stem cells is expected to lead to the development of next-generation molecularly targeted therapeutics. In this study, we aimed to elucidate the role of organelle stress response in stem cell proliferation and differentiation, and furthermore, to differentiate cancer stem cells into less invasive and less metastatic cancers through its regulation. We investigated the involvement of organelle stress response signaling in stem cells and revealed the importance of endoplasmic reticulum quality control for stem cell proliferation and differentiation. The results of this study are expected to be a new molecular target for cancer therapy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、無制限の分裂能を獲得し自律的に異常増殖した細胞の集まりである。がんの実態は、単一のがん化細胞から分裂した均一な細胞集団のように捉えられがちであるが、実際には不均質でヘテロな集塊である。不均質な細胞集団から、高浸潤能や高転移能を獲得したがん細胞、あるいは薬剤耐性を獲得した耐性がん細胞が発生し、がんの高度悪性化(高浸潤性や高転移性)に繋がる。多くのがんには、基底層にがん組織の形成および発達を維持し続ける細胞、いわゆるがん幹細胞が存在するといわれる。がん幹細胞こそが、がんの不均質性を生み出し、がんの転移や再発に繋がると想定されている。様々な臓器でがん幹細胞の存在が報告されており、口腔領域においても例外ではなく、頭頸部扁平上皮がん組織から、CD44+がん細胞が、幹細胞としての能力すなわち自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能と、多種類の細胞に分化しうる多分化能を同時に持つ。このようながん幹細胞は、細胞周期を標的とした抗がん剤や、そのシグナル伝達経路を標的とした分子標的治療薬による化学療法にも関わらず、再発を繰り返す腫瘍の高度悪性化を説明しうる。すなわち、がん幹細胞のなかにG0期のものが現われた場合、薬剤感受をまぬがれる可能性がある。もし、がん幹細胞を完全に分化させて多分化能を排除出来れば、外科的、化学的、放射線療法により完全治癒させることも理論上可能となる。このような視座に立った新たながんの分子メカニズム解明は、無尽蔵な増殖と転移により重度な機能障害、さらには生命の危機をもたらす口腔がんの克服に不可欠である。がん幹細胞の発起源については、基底層にもともと存在するごく一部の幹細胞が無限の増殖能を獲得する説と、既に増殖能を獲得したがん細胞が脱分化することにより多分化能を獲得する説が考えられる。口腔領域は、その臓器環境から常に様々な化学的、物理的、機械的ストレスに曝されており、そこから発生するストレスシグナルは両説を説明し得る。

### 2. 研究の目的

腫瘍が不均質性を備えたがん細胞集団で構成されていることに起因する獲得耐性がんのような現象は、がん根治を困難なものとしており、そのメカニズム解明は急務である。がん幹細胞の生存、増殖および分化能を制御するシグナル伝達経路は、新たな創薬ターゲットになると期待されており、そのような分子標的に資するがん幹細胞悪性化の分子メカニズム解明を本研究の目的とした。申請者は、これまでオルガネラが受容するストレスとそこから発信されるストレスシグナル伝達機構に関する研究を推進してきた。とくに生体内において、小胞体ストレスやミトコンドリアストレスを惹起する低酸素、虚血、栄養飢餓ストレスによるオルガネラ品質管理機構の破綻やオルガネラ連携(小胞体-ミトコンドリア間)シグナルの破綻による、疾患分子メカニズムに関する研究を進めてきた。口腔領域のがんは、扁平上皮がん、唾液腺がんに代表される固形がんがほとんどである。これらの固形がん組織中心部においては、低栄養、低酸素状態の遷延化により、不良タンパク質蓄積やカルシウム恒常性破綻などによる小胞体ストレス状態に陥ること、あるいはATP産生がミトコンドリア酸化的リン酸化から解糖系に遷移すること(Warburg効果)が知られている。申請者は、小胞体品質管理機構の解明と、その破綻による疾患の分子メカニズムを明らかにしてきた中で、マウスを用いた実験から、小胞体品質管理機構の破綻が、幹細胞の細胞周期制御を不能にし無尽蔵に細胞増殖させることを初めて発見していた。一方、ミトコンドリア機能については、その破綻が代謝性疾患に関与することを報告し、最近の実験結果からは、培養細胞でのATP合成を解糖系から酸化的リン酸化にシフトさせることで、小胞体-ミトコンドリア間クロストークを介したシグナル伝達が発信されることを発見していた。このような予備的知見に基づき、がん細胞の生存と不均質性獲得に関連性が高い小胞体、ミトコンドリアから発信されるストレス応答が、がん幹細胞の維持と悪性化にどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

頭頸部腫瘍においてがん幹細胞の存在が示されているものの、その細胞内分子機構については未解明であった。本研究では次の2点を明らかにすることを目指した。

(1) 表面マーカーを指標にがん幹細胞を分離後、同一ヒト組織由来のがん細胞との共培養により、口腔がん幹細胞をがん組織に近い環境で培養し、オルガネラ品質管理とその破綻によるストレスシグナル伝達経路の関与について検討した。

(2) 小胞体およびミトコンドリア関連分子の遺伝子改変マウスを用いて、がん幹細胞の高度悪性化への関与を検討した。

口腔がん幹細胞の単離と培養: ヒト口腔がんより、がん幹細胞を単離を目指した。単離したがん幹細胞は、スフェロイド形成に最適化された無血清培地により培養し、口腔領域腫瘍におけるがん幹細胞の存在を実証した。

口腔がん幹細胞におけるオルガネラストレス応答の役割の検討: 申請者が同定した、小胞体品質管理に必須の分子Derlin-1を遺伝子欠損することで誘導される小胞体ストレスは、幹細胞の活動期から静止期への移行を破綻させ、細胞周期を活性化し異常増殖させる。そこで、Derlin-1遺

伝子欠損による口腔がん幹細胞のスフェロイド形成への影響を検討した。  
ミトコンドリアストレスに関する検討：幹細胞の未分化性維持には、ミトコンドリア酸化的リン酸化の抑制と解糖系の活性化が関与する。申請者らは、解糖系⇄酸化的リン酸化のスイッチに、ミトコンドリアストレスによる小胞体センサー分子 PERK の特異的活性化が関与することを見出している。そこで、ミトコンドリアストレスのみを受容できない PERKMito-negative あるいは活性化体 PERKMito-active 遺伝子導入し、小胞体-ミトコンドリア間クロストークシグナルの必要性について検討した。  
がん幹細胞におけるオルガネラストレス応答シグナルの検討：がん幹細胞とその遺伝子変異株細胞において、小胞体とミトコンドリアのストレス状態をそれぞれのストレス応答マーカーで観察した。さらに、RNA sequence とその結果を用いた遺伝子オントロジー解析により、オルガネラストレス応答シグナルとその下流の遺伝子変動について解析した。  
がん組織培養における口腔がん幹細胞共培養系の確立：実際のがん組織環境を再現するために、培養系で同一ヒトがん組織より単離したがん細胞とがん幹細胞を培養する系を構築した。  
口腔がん幹細胞の増殖・分化へのオルガネラストレス応答の役割検討 (in cell): 上記共培養系において、がん幹細胞での ERstress res と Mitostress res について、それぞれの下流遺伝子発現を応用したプローブで評価し、解糖系依存の培養条件 (がん組織環境) と、酸化的リン酸化の培養条件 (がん組織環境の解除) での差異を検討した。  
口腔がん幹細胞の増殖・分化へのオルガネラストレス応答の役割検討 (in vivo): 小胞体ストレスとミトコンドリアストレスの関与をマウス個体がん組織で評価するために、がん細胞とがん幹細胞の共培養がん組織をマウス皮下投与し、がんの転移能、浸潤能を指標とした評価を行った。その際、がん幹細胞 (cell autonomous)、がん細胞 (non-cell autonomous) あるいはマウス (environment) の何れのオルガネラストレスが関与するかを明らかにするため、それぞれのノックアウト/ノックイン細胞あるいはマウスを用いる。マウスについては、小胞体ストレスに必須な Derlin-1 コンディショナルノックアウトマウスを作製済みで、ミトコンドリアストレスについては PERKMito-negative ノックインマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

口腔がん幹細胞の単離と培養：扁平上皮がんと唾液腺がん細胞より、セルソーターにより、がん幹細胞を単離した。単離したがん幹細胞は、スフェロイド形成に最適化された無血清培地により培養した。これにより、口腔領域腫瘍におけるがん幹細胞の存在を実証した。  
口腔がん幹細胞におけるオルガネラストレス応答の役割の検討：小胞体ストレスに関する検討：申請者が同定した、小胞体品質管理に必須の分子 Derlin-1 を遺伝子欠損することで誘導される小胞体ストレスは、幹細胞の活動期から静止期への移行を破綻させ、細胞周期を活性化し異常増殖させる。そこで、Derlin-1 遺伝子欠損による口腔がん幹細胞のスフェロイド形成への影響を検討した。ミトコンドリアストレスに関する検討：幹細胞の未分化性維持には、ミトコンドリア酸化的リン酸化の抑制と解糖系の活性化が関与する。申請者らは、解糖系⇄酸化的リン酸化のスイッチに、ミトコンドリアストレスによる小胞体センサー分子 PERK の特異的活性化が関与することを見出している。そこで、ミトコンドリアストレスのみを受容できない PERKMito-negative を CRISPR/Cas9 により遺伝子導入したマウスを作出することに成功した。がん幹細胞に必要なミトコンドリアと小胞体の機能について、特に代謝に関する解析を実施し、PERK リン酸化の重要性を示唆する結果を得た (Kato et al. Life Science Alliance 2020)。また、Derlin-1 については、がん生存に必要なコレステロール合成に関与することが明らかとなり、論文として投稿し受理された (Sugiyama et al. iScience in press)。

## 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 4件）

1. 著者名 Kato Hironori, Okabe Kohki, Miyake Masato, Hattori Kazuki, Fukaya Tomohiro, Tanimoto Kousuke, Beini Shi, Mizuguchi Mariko, Torii Satoru, Arakawa Satoko, Ono Masaya, Saito Yusuke, Sugiyama Takashi, Funatsu Takashi, Sato Katsuaki, Shimizu Shigeomi, Oyadomari Seiichi, Ichijo Hidenori, Kadowaki Hisae, Nishitoh Hideki	4. 巻 3
2. 論文標題 ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900576	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 Tatenaka Yuki, Kato Hironori, Ishiyama Munetaka, Sasamoto Kazumi, Shiga Masanobu, Nishitoh Hideki, Ueno Yuichiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Monitoring Lipid Droplet Dynamics in Living Cells by Using Fluorescent Probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 499 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b01071	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 Nishitoh Hideki	4. 巻 165
2. 論文標題 Paradigm shift from 'Compartment' to 'Zone' in the understanding of organelles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 97 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy107	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 Kadowaki Hisae, Nishitoh Hideki	4. 巻 286
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum quality control by garbage disposal	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 232 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14589	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 Kadowaki Hisae, Satrimafitrah Pasjan, Takami Yasunari, Nishitoh Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25724-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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hideki Nishitoh
2. 発表標題 Regulation of brown adipocyte function through the crosstalk signaling between mitochondria and the ER
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironori Kato and Hideki Nishitoh
2. 発表標題 PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue
3. 学会等名 EMBO Workshop Proteostasis: From organelles to organisms(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西頭英起
2. 発表標題 Crosstalk signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum is essential for brown adipocyte function
3. 学会等名 Keystone Symposia conference "Mitochondrial Biology"(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Nishitoh
2. 発表標題 Crosstalk signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum is essential for brown adipocyte function
3. 学会等名 Cell Symposia “Multifaceted Mitochondria” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西頭英起、門脇寿枝
2. 発表標題 Translational regulation of newly synthesized protein in ER stress-induced pre-emptive quality control
3. 学会等名 International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤裕紀、西頭英起
2. 発表標題 Unconventional PERK signaling regulates mitochondrial function in brown adipocytes
3. 学会等名 EMBO Workshop “Endoplasmic reticulum function in health and disease” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇寿枝、西頭英起
2. 発表標題 Regulation of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced pre-emptive quality control
3. 学会等名 EMBO Workshop “Endoplasmic reticulum function in health and disease” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西頭英起
2. 発表標題 オルガネラから発信されるシグナルによる生体の機能制御
3. 学会等名 第13回臨床ストレス応答学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 プローブ、ミトコンドリアの状態判定用キット、ミトコンドリアの状態判定方法及びミトコンドリア機能改善剤のスクリーニング方法	発明者 西頭英起、加藤裕紀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-234295	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	泰江 章博  (Yasue Akihiro)  (80380046)	徳島大学・病院・講師   (16101)	追加：2020年1月7日
研究分担者	高雄 啓三  (Takao Keizo)  (80420397)	富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・教授   (13201)	

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