

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09533

研究課題名(和文)細胞死を起点とするがん進展機構：ダイニングコードの解明と標的化戦略

研究課題名(英文)Cell death-driven mechanisms for cancer progression: targeting the dying codes

研究代表者

山崎 学 (Yamazaki, Manabu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10547516

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)：口腔扁平上皮癌を含む悪性腫瘍では、細胞死をきたしたがん細胞が高頻度に認められるが、このような死細胞の意義は十分に解明されていない。本研究では、「細胞死をきたしたがん細胞が周囲のがん細胞を活性化させ、がん進展促進に寄与する」という仮説のもと、口腔扁平上皮癌由来培養細胞を用いて仮説を検証した。ネクローシスを誘導したがん細胞との共培養により、生活がん細胞の増殖能、遊走・浸潤能が亢進した。その際、生活がん細胞ではNF-κBシグナリング経路の活性化、種々の炎症性サイトカイン産生が誘導された。以上から、細胞死をきたしたがん細胞が周囲のがん細胞を活性化させることで、がん進展の起点となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、腫瘍組織内で生じた死細胞が増殖・遊走・浸潤といった細胞活性化の起点となること、さらに分子機序としてToll-like受容体およびNF-κB経路の関与が明らかとなった。本研究の成果は、化学放射線療法後の腫瘍再発メカニズムの解明に寄与するとともに、新規制癌治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cell death through apoptosis and/or necrosis is frequently observed in malignant tumor tissues, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, a significance of dead tumor cells has not been fully understood. On a hypothesis that dead tumor cells activate neighboring tumor cells and promote tumor progression, we performed the experiments using OSCC-derived cultured cells. Consequently, necrotic OSCC cells robustly activated proliferation, migration and invasion of living OSCC cells. Moreover, necrotic OSCC cells induced activation of NF-κB pathway and increased production of inflammatory cytokines. Our study demonstrated dead tumor cell-induced cellular activation mechanisms in OSCC.

研究分野：口腔病理学

キーワード：細胞死 口腔がん アポトーシス ネクローシス ダイニングコード

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は高い自律的増殖能を有する反面、高頻度に細胞死をきたす。病理診断医は、がん細胞のアポトーシスや壊死の程度が悪性度の指標となることを経験的に知っている。実際、種々のがんにおいて、がん細胞のアポトーシス頻度が悪性度や予後不良のマーカーになることが報告されている。その理由として、遺伝子変異による生存シグナル異常や病変増大に伴う循環障害により、結果的に細胞死が生じるという考えが一般的に受け入れられているが、細胞死をきたしたがん細胞が生活がん細胞に及ぼす影響はいまだ十分に解明されていない。

近年、死細胞は単なる廃棄物ではなく、情報発信源として機能し、個体発生や組織再生、免疫応答といった様々な生体応答の起点となることがわかってきた。死細胞が発信する生理活性物質は、本邦の研究者らによって「ダイニングコード」と名付けられ、新たな研究対象として注目されつつある。

我々はこれまでに科学研究費の継続的支援を得て、がん細胞が同種のアポトーシス細胞を貪食処理する現象に注目し、その生物学的意義を究明してきた。その研究過程において、ネクローシスをきたしたがん細胞が、貪食を介する機序とは異なる細胞活性化作用を有する可能性を見出した。そこで、我々は「ネクローシスをきたしたがん細胞がダイニングコードを発信し、周囲のがん細胞を活性化させ、その結果、がん進展が促進される」という仮説を立て、その検証を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ネクローシスをきたしたがん細胞と生活がん細胞との間で授受されるダイニングコードを検索するとともに、それらがどのようにがん進展に寄与するのかを解明して、標的化治療への展望を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 死細胞誘導と共培養実験: 3種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株 (Ca9-22, HSC-2, HSC-3) を用いて、液体窒素および湯浴での凍結融解をおこない、細胞死を誘導した。フローサイトメトリーによる解析では、処理細胞の大部分は annexin V(-)/propidium iodide(+) を示し、ネクローシスの状態と判断された。生活細胞と死細胞との比率を 1:2 に調整し、生活細胞に死細胞を直接添加した接触共培養条件と、1 μ m のポアを有するメンブレンにより死細胞と隔てた状態で共培養した非接触共培養条件を、生活細胞のみの単独培養条件と比較した。共培養には無血清培地を用い、16 時間までおこなった。細胞形態を位相差顕微鏡観察および迅速ギムザ染色にて確認した。

(2) 細胞増殖マーカーの検索: 上記3条件において、S~M期マーカーである geminin に対する免疫細胞化学をおこなった。ランダムに撮影した5視野において、NIS Elements Ar を用いて合計500個以上の細胞を対象として geminin 陽性細胞および陰性細胞を自動カウントし、geminin 陽性細胞率を算出した。

(3) 遊走試験: 非接触共培養条件において、死細胞添加から12時間の細胞運動を5分間隔でタイムラプス撮影し、NIS Elements Ar を用いてトラッキング解析をおこなった。各群50個以上の細胞を対象とし、細胞移動積算距離と速度を算出した。単独培養条件をコントロールとした。

(4) ゼラチンゼイモグラフィーによる MMPs 活性化の検討: 上記3条件から培養上清を回収し、ゼラチンゼイモグラフィーに供した。

(5) スフェロイド浸潤試験: 低接着表面ウェルプレートに10,000個の細胞を播種し、24時間培養することでスフェロイドを作製した。スフェロイドをGFRマトリゲルに包埋し、その上に培地単独または10,000個のネクローシス細胞を含む培地を積層して、96時間培養した。96時間後にスフェロイド形状を実体顕微鏡で観察した。

(6) マイクロアレイによる発現解析: 単独培養条件および非接触共培養条件(16時間)のHSC-3細胞からtotal RNAを回収し、マイクロアレイ発現解析(SurePrint G3 Human 8x60K v3)に供した。分析は株式会社セルイノベーターに委託した。1.5倍以上または0.66倍未満の発現変動を示す遺伝子を抽出し、DAVIDおよびPantherによりパスウェイ解析をおこなった。

(7) 抗体アレイによるサイトカイン検索: 項目(6)と同一のサンプル由来の培養上清を回収し、サイトカイン抗体アレイ解析(Proteome Profiler Human XL Cytokine Array)をおこなった。

(8) 定量 PCR・免疫蛍光染色・ウェスタンブロット: 項目(6)で変動が認められた分子に対して、定量 PCR および免疫蛍光染色、ウェスタンブロットにて検証をおこなった。

4. 研究成果

(1) 死細胞存在下での生活がん細胞の形態・機能変化

死細胞と 16 時間共培養後に細胞形態を観察したところ、いずれの細胞株でも接触共培養条件・非接触共培養条件ともに細胞間距離が増加し、とくに HSC-3 細胞では、細胞形状の紡錘形変化が明らかであった。単独培養群と比較して、geminin 陽性細胞率は接触共培養条件のみならず非接触共培養条件においても有意な増加が認められた。これより、死細胞による細胞形態および細胞増殖能の変化は、死細胞との直接接触の有無にかかわらず生じることが示された。

遊走能の検討は自動トラッキングをおこなう都合上、非接触共培養条件のみの解析に限られたが、いずれの細胞株でも単独培養条件に比べて、細胞移動距離・速度ともに有意に上昇した(図 1, 上段)。

ゼラチンザイモグラフィーの結果から、HSC-2・HSC-3 において、死細胞添加による MMP の活性化が確認された。スフェロイド浸潤試験でも、HSC-2・HSC-3 で死細胞を添加した際に、スフェロイドからの浸潤が認められた(図 1, 下段)。

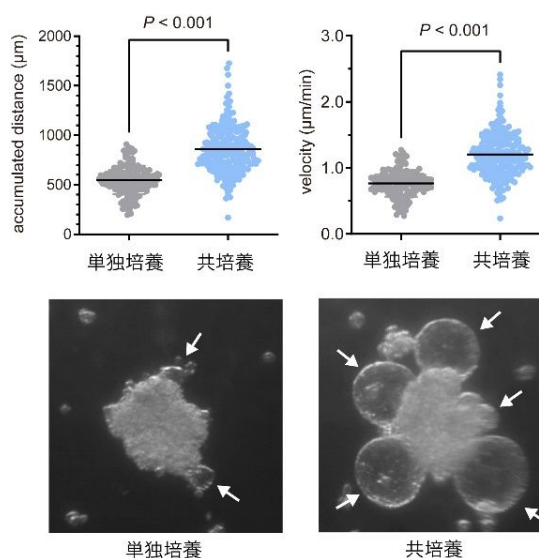


図 1 ネクローシス細胞との共培養による変化
上段: 細胞遊走トラッキング
下段: スフェロイド浸潤試験
← マトリゲル内への出芽状浸潤を示す

(2) ネクローシス細胞との共培養による遺伝子・サイトカイン発現プロファイル変化

マイクロアレイ発現解析の結果、死細胞添加により発現上昇した遺伝子として 510 個、発現低下した遺伝子として 648 個が見出された。発現亢進した遺伝子には、CXCL8, IL-1, TNF-, IL-6 等の炎症性サイトカインに加えて、TLR2, TLR4 等のパターン認識受容体が含まれていた。TLR2, TLR4 については定量 RT-PCR でも発現上昇を確認した。さらに、サイトカイン抗体アレイ解析によって、各種炎症性サイトカイン、MMP-9 や VEGF などのがん進展にかかわる分子の発現上昇が確認できた。

また、パスウェイ解析の結果より、TLR を起点とした NF- κ B 経路の活性化が示唆されたため、免疫蛍光法で NF- κ B p65 の局在を検索したところ、接触・非接触共培養条件ともに、死細胞添加後 1 時間の時点で NF- κ B p65 が細胞質から核内へ移行していた。細胞質・核分画でのウェスタンブロットによっても、NF- κ B p65 のリン酸化と核移行が確認された。死細胞添加で TLR が発現上昇した点から、TLR によって認識される damage-associated molecular patterns (DAMPs) がダイニングコードとして機能する可能性が示唆されたものの、研究期間内でダイニングコードの同定には至らなかったが、今後も検索を継続する予定である。

(3) 実験結果の評価と研究の総括

これまでの研究結果から、以下のように結論した。

口腔扁平上皮癌細胞では、同種ネクローシス細胞によって増殖・遊走・浸潤が亢進する。

細胞活性化機序には、TLR/NF- κ B 経路依存性に産生される炎症性サイトカインが関与することが示唆される。

本研究の結果から、腫瘍細胞は同種死細胞さえも自らの生存・成長の原動力にする、したたかな性質を有することが明らかとなった。死細胞を起点とする分子機序の解析により、化学放射線療法後の腫瘍再発メカニズム解明に寄与するとともに、新規制癌治療法の開発とつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Tsuneki M, Kato H, Izumi K, Tanuma JI, Cheng J, Saku T.	4. 巻 392
2. 論文標題 Rac1-dependent phagocytosis of apoptotic cells by oral squamous cell carcinoma cells: A possible driving force for tumor progression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	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） 10.1016/j.yexcr.2020.112013	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 Sakurai K, Tomihara K, Yamazaki M, Heshiki W, Moniruzzaman R, Sekido K, Tachinami H, Ikeda A, Imaue S, Fujiwara K, Noguchi M.	4. 巻 26
2. 論文標題 CD36 expression on oral squamous cell carcinoma cells correlates with enhanced proliferation and migratory activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 745-755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13210	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 Abe T, Kitagawa N, Yoshimoto S, Maruyama S, Yamazaki M, Inai T, Hashimoto S, Saku T.	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 Sakurai K, Nakamori K, Yamazaki M, Tanuma JI.	4. 巻 49
2. 論文標題 An ectomesenchymal chondromyxoid tumour on the lateral border of the tongue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 1290-1293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2020.04.010	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 Maeda SI, Fujiwara K, Tomihara K, Yamazaki M, Imaue S, Noguchi M.	4. 巻 18
2. 論文標題 A case of anti laminin 332 mucous membrane pemphigoid manifesting as desquamative gingivitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 73-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1073	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 Yamada K, Tomihara K, Yamazaki M, Noguchi M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Severe stomatitis caused by misuse of methotrexate in an elderly patient with chronic rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 284-287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.06.009	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 Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Niimi K, Kobayashi T, Nishiyama H, Hayashi T, Tanuma J	4. 巻 31
2. 論文標題 Masseter muscle hypertrophy: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 428-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.08.005	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 Niimi K, Shingaki S, Funayama A, Mikami T, Nishiyama H, Hayashi T, Yamazaki M, Maruyama S, Saku T, Kobayashi T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Oral and maxillofacial manifestations of methotrexate-associated lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis: Report of a case.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 86-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.07.010	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 Sumita Y, Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Cheng J, Takagi R, Tanuma JI.	4. 巻 40
2. 論文標題 Cytoplasmic expression of SOX9 as a poor prognostic factor for oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2487-2496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6665	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎 学, 丸山 智, 阿部達也, 朔 敬, 田沼順一
2. 発表標題 がん細胞による死細胞貪食は細胞遊走とDKK1発現を促進する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haga K, Yamazaki M, Maruyama S, Kobayashi T, Tanuma J.
2. 発表標題 Cancer-associated fibroblasts promote the migration and invasion of oral cancer cells via enhancing SOX9 expression.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maruyama S, Yamazaki M, Tanuma J.
2. 発表標題 Hypoxia-induced proliferation in salivary pleomorphic adenoma cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 学, 丸山 智, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における死細胞誘導性細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 学, 丸山 智, 常木雅之, 田沼順一
2. 発表標題 口蓋に生じた唾液腺導管癌の一例
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2018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	田沼 順一 (Tanuma Jun-ichi) (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究 分担者	丸山 智 (Maruyama Satoshi) (30397161)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	

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