

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09748

研究課題名(和文) 腺様嚢胞癌細胞の浸潤、転移制御機構に関わるID2分化抑制因子の役割の解明

研究課題名(英文) Targeting ID2 expression reduces aggressiveness in human salivary gland cancer cells

研究代表者

住田 知樹 (Sumida, Tomoki)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：50314951

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、ID2発現抑制による増殖および浸潤能における影響を確認した。ID2の発現抑制にて唾液腺癌細胞の増殖および浸潤能ともに有意に抑制された。引き続き、ID2 antisense vector導入唾液腺腫瘍細胞を使用して得られる増殖および浸潤能抑制効果のメカニズムをin vitroにて解析した。これらの細胞ではc-mycの発現抑制やp21などの細胞周期関連タンパクの発現亢進などが見られた。また、MMP9発現の有意な抑制とE-cadherin発現の亢進も明らかとなった。以上より、ID2の発現は細胞周期関連タンパクやMMP、接着分子の発現に関与し、細胞の増殖浸潤能に影響を与えていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト口腔癌の約85%は扁平上皮癌であり、残りの15%を唾液腺癌、肉腫が占めている。唾液腺癌が口腔癌に占める割合は少ないが、放射線化学療法感受性が良好な扁平上皮癌に対し、唾液腺癌は外科的切除以外、現在有効な治療法が確立されていない。加えて組織型、細胞特性なども多彩で、それにより浸潤、転移の早さも異なるため、さらに治療を困難にしている。

今回、我々はこの点に着目し、ID2をターゲットとした新規治療により、一般に発育の遅いとされる唾液腺癌の発育をさらに遅らせることで担癌状態での患者QOL向上につながると考えた。

研究成果の概要(英文)：ID2 knockdown triggers important changes in salivary gland cancer (SGC) cell behavior, that is, it significantly reduces the expression of c-myc and N-cadherin, induces p21, and E-cadherin expression and leads to a more differentiated phenotype exemplified by changes in cell shape. Moreover, ID2 knockdown suppresses the expression of matrix metalloproteinase 9. In conclusion, ID2 expression maintains an aggressive phenotype in SGC cells, and ID2 repression triggers a reduction in SGC cell aggressiveness. ID2 therefore represents a potential therapeutic target during SGC progression.

研究分野：口腔外科学

キーワード：腺様嚢胞癌 浸潤 転移 ID2分化抑制因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト口腔癌の約 85%は扁平上皮癌であり、残りの 15%を唾液腺癌、肉腫が占めている。唾液腺癌が口腔癌に占める割合は少ないが、放射線化学療法感受性が良好な扁平上皮癌に対し、唾液腺癌は外科的切除以外、現在有効な治療法が確立されていない。加えて組織型、細胞特性なども多彩で、それにより浸潤、転移の早さも異なるため、さらに治療を困難にしている。

今回、我々はこの点に着目し、ID2 をターゲットとした新規治療により、一般に発育の遅いとされる唾液腺癌の発育をさらに遅らせることで担癌状態での患者 QOL 向上につながると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では研究代表者が一貫して研究してきた唾液腺癌と関係の深い転写因子である ID 遺伝子ファミリーが唾液腺癌の増殖や局所浸潤に与える影響を深く掘り下げることにより、長期担癌生存、いわゆる Dormancy を目指した唾液腺癌治療法の開発を目的とした。

本研究では ID ファミリーの中で唾液腺癌細胞において発現の強い ID2 タンパクをターゲットとした。ID2 タンパク発現が強いことが明らかになっている唾液腺癌細胞 ACCM を用いて増殖、浸潤に関わる分子の影響を明らかにすることにより、上記目的の達成を目指した。

3. 研究の方法

ID2-antisense ベクターをリポフェクション法にて ID2 高発現唾液腺癌細胞株 ACCM に導入し ID2 の発現が抑制されたクローンを作成し実験に用いる。

In vitro にて、ID2-antisense 導入 ACCM 細胞における、細胞増殖、細胞浸潤に関連する分子の動態を明らかにする。

細胞増殖に関しては Cell counting やスクラッチアッセイなどにて解析するとともに、c-myc や p21 などの細胞周期関連タンパクの発現をウエスタンブロットングにて調べる。

細胞浸潤に関しては、ポイデンチャンバーインベジションアッセイにて評価を行う。また、接着因子である Cadherin ファミリーやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現動態を、ウエスタンブロットングやゼラチンザイモグラムにて明らかにする。

4. 研究成果

ID2-sense 及び antisense 導入 ACCM 細胞のスクリーニングのため、各種抗体を用いたウエスタンブロットングを行った。コントロール細胞に比べ、ID2-sense 導入 ACCM 細胞では発現が増強し、ID2-antisense 導入 ACCM 細胞では発現が抑制され、実験材料として適していることが示された。また、ID1 や ID3 など他の ID ファミリータンパクの発現への影響は確認されなかった。ID2-antisense 導入 ACCM 細胞においては、接着分子の中で E-cadherin 発現の有意な亢進が見られ、N-cadherin に関しては逆に発現抑制が見られた。また、c-myc の発現抑制や p21 などの細胞周期関連タンパクの発現亢進などの変化が確認された。ID2 発現抑制にて、細胞接着は強固になり、また、増殖は抑制されることが示唆された。また、これらの結果を裏付けるように、ID2-antisense 導入 ACCM 細胞では、上皮間葉移行において重要な役割を果たす分子 Snail の発現も有意に抑制されていた (図1)。

引き続き、細胞増殖と細胞の形態変化を観察した。Cell counting により、ID2-antisense 導入 ACCM 細胞ではコントロール細胞に比べ有意に細胞増殖能が抑制されていた。これに対し、ID2-sense 導入 ACCM 細胞では増殖能の亢進が見られた (図2.A)。ID2 の発現が細胞増殖の制御において重要な役割を果たしていることが示唆された結果である。

また、これだけでなく細胞形態の変化も確認された。ID2-antisense 導入 ACCM 細胞では細胞は扁平化し敷石状を呈していた。対して ID2-sense 導入 ACCM 細胞では細胞は密集した増殖形態を示すとともに、重層化する傾向が見られた。ID2 の発現の差により、明らかな細胞形態の違いが確認された (図2.B)。

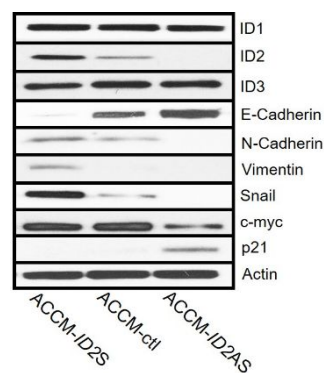


図1.

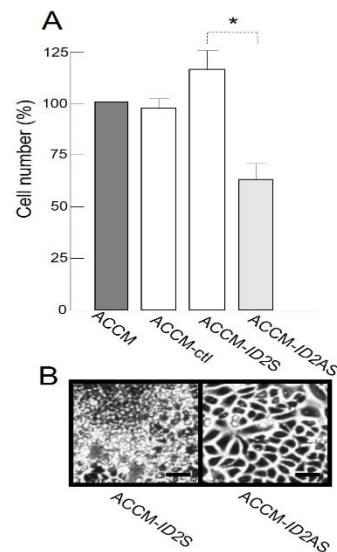


図2.

次いで細胞浸潤に関してボイデンチャンバーインベイジョンアッセイにて評価した。ID2-sense導入ACCM細胞では、細胞数の有意な低下が見られ、浸潤能が抑制されていることが示唆された(図3.A)。

また、ゼラチンザイモグラムでの評価では、MMP9の活性及びタンパク発現ともに低下が見られた。MMP2には有意な変化は見られなかったことから、MMP9を介した細胞浸潤を抑制している可能性が示唆された(図3.B)。

以上の結果により、唾液腺癌細胞においてID2のノックアウトにより細胞増殖及び浸潤は抑制されることが明らかとなった。それら悪性形質の抑制にはCadherinファミリーや細胞周期関連タンパク、MMP9の発現が深く関わっていることが示唆された。

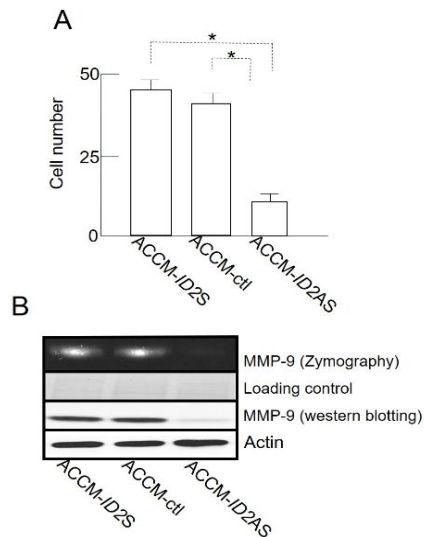


図3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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