

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09813

研究課題名（和文）口腔癌細胞のEMT調節機構におけるZIPファミリー分子の解析

研究課題名（英文）slc39a-dependent regulation for EMT of OSCC

研究代表者

島末 洋（Hiroshi, Shimasue）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：40335683

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）：当初一方向性に間葉形質を固定すると想定したSnail強制発現によるEMTは、実際にはSnailが恒常的に発現したまま可逆性を保持し、容易にMETを実現できた。さらにSnail発現OM1からMET抵抗性のクローンを選択し維持することに成功した。これにより、OM1のゲノムバックグラウンドで上皮形質のみ保持、EMT-MET形質保持、EMT形質保持の3群の遺伝子発現プロファイリングが可能となり、SLC39AファミリーによるEMT-MET制御機構およびp75NTR陽性上皮プロジェクト依存的な上皮リネージ維持機構を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本計画で確立できた、OM1のゲノムバックグラウンドで上皮形質のみ保持、EMT-MET形質保持、EMT形質保持の3群の遺伝子発現プロファイルはRNAseq法で得た膨大なデータであり、研究データベースとして世界的に活用が可能である。

研究成果の概要（英文）：EMT by forced Snail expression, which was initially assumed to fix the mesenchymal trait in one direction, maintained reversibility while Snail was constitutively expressed. Furthermore, we succeeded in selecting and maintaining MET-resistant clones from Snail-expressing OM1. This enables gene expression profiling of three groups of epithelial trait retention, EMT-MET trait retention, and EMT trait retention in the OM1 genome background.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：EMT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究組織は、ホモフィリックな扁平重層上皮細胞接着に必須である E カドヘリンを保持するヒト重層扁平上皮癌由来細胞株 OM1 を樹立し、分子生物学的キャラクタライズを実施してきた。未分化癌は病理学的に上皮形質を代表するホモフィリックな細胞接着を喪失しているため間葉への浸潤、転移が促進されるが、上皮形質を喪失する段階を経ること必須となる。

そこで OM1 に対し E カドヘリン転写抑制因子 Snail による一方向性の上皮間葉転換 (EMT) を再現し、癌浸潤メカニズム解明を目指してきた。

一方、発生過程では上皮細胞が間葉形質へ転換 (EMT) し、遠隔地へ移動し、そこで再び上皮形質へ戻る (MET) ことで器官形成を達成することが知られている。上皮形質へ戻る機構、すなわち一端 ON となった Snail の機能を OFF とする機構が存在し、これは、重層扁平上皮癌が遠隔転移巣で、再び原発巣と同じ重層扁平上皮を構成する機構となると考えその解析を計画した。

2. 研究の目的

方法に記載したように、口腔扁平上皮癌細胞 OM1 に Snail ファミリーが発現しているにもかかわらず、EMT-MET を可逆的に制御している機構を探索する。

また、MET においては重層扁平上皮リネージを生み出す機構を検証する。

3. 研究の方法

Snail 強制発現により扁平上皮細胞株 OM1 に EMT を誘導する実験系は本研究組織で確立した系を用いた。

また、環境依存的な(サイトカイン刺激、物理的的刺激)可逆性 EMT-MET の実験系を構築した。

遺伝子発現プロファイリングにはマイクロアレイ法及び RNAseq 法を用いた。

既に下等生物で Zn トランスポーター LIV1 (SLC39A6) が Zn フィンガースモチーフを持つ Snail の機能を生に制御することが報告されたため、本研究ではヒト Zn トランスポーター SLC30,39 (ファミリー)に着目して研究を進めた。

また、成果を得るため上皮リネージマーカー KRT14/13、上皮リネージプロジェクターマーカー p75NTR を用いた。

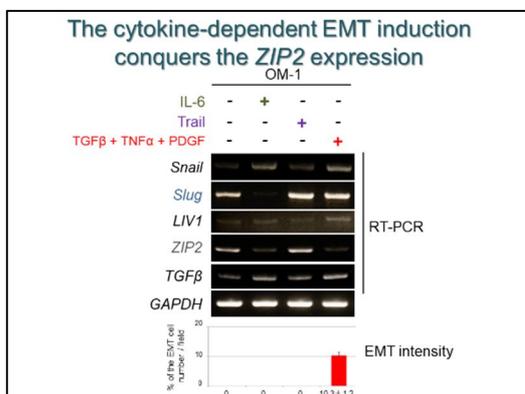
4. 研究成果

当初一方向性に間葉形質を固定すると想定した Snail 強制発現による EMT は、実際には Snail が恒常的に発現したまま可逆性を保持し、容易に MET を実現できた。

さらに Snail 発現 OM1 から MET 抵抗性のクローンを選択し維持することに成功した。

これにより、OM1 のゲノムバックグラウンドで上皮形質のみ保持、EMT-MET 形質保持、EMT 形質保持の 3 群の遺伝子発現プロファイリングが可能となった。

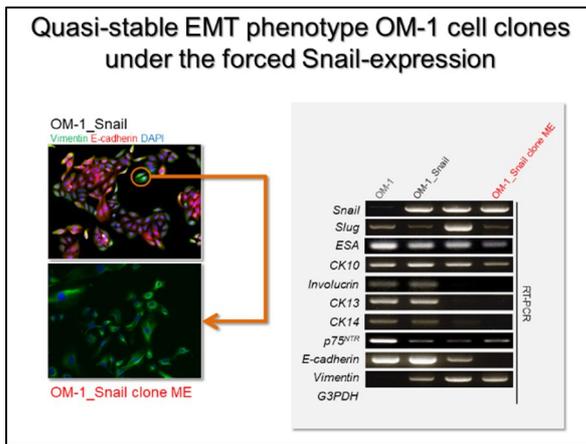
Snail ファミリー分子 Slug は健全な恒常的に発現することが知られ、扁平上皮リネージの制御に関与することが知られているが、OM1 細胞にも恒常的に発現していた。そこで、Slug 依存的な発現を示す上皮リネージマーカーを Slug 強制発現 OM1 細胞を用いて探索したところ、扁平重層上皮の分化度と相関する Zn トランスポーター ZIP2 (SLC39A2) 遺伝子が抽出された。既に下等生物で Zn トランスポーター SLC39A6 が Zn フィンガースモチーフを持つ Snail の機能を生に制御することが報告されたため、上記 3 群の SLC39A 遺伝子ファミリーの発現プロファイルを検討した。



その結果、EMT では SLC39A2 から A6 への Zn トランスポータースイッチングが伴うことが判明した。また、SLC39A2 の発現抑制には Snail 発現に伴う Slug 発現の抑制が必須であり、SLC39A6 の発現亢進は Snail 発現に伴う IL-6、TGF β 発現誘導が直接的に関与すると考えられた。

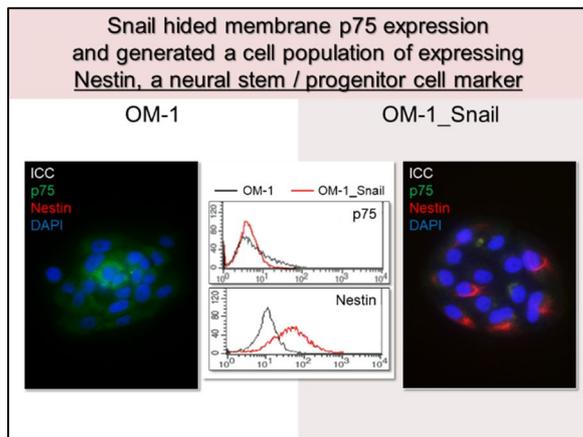
興味深いことに、Snail および Slug を強制発現した OM1 は EMT 形質を固定し MET 抵抗性を示し Slug 依存的 SLC39A2 発現は抑制されていた。また環境依存性(wounding+サイトカイン添加)に OM1 に EMT を誘導した際には、内在性 Snail と内在性 Slug、

そして SLC39A6 はともに発現亢進し、SLC39A2 は発現抑制されていた。この環境依存性の EMT はサイトカイン除去あるいは wound heal により解除され MET が観察でき、それに従い Zn トランスポーターは SLC39A6 から SLC39A2 へスイッチバックした。



現することが判明した。また上皮プロジェニターマーカー p75NTR を発現する細胞は数%のみ散在し、通常細胞膜に均一局在する p75NTR は特徴的なラフト様クラスターを形成していた。単細胞からのコロニー形成で上皮リネージ形成を検討したところコロニーは中心の数細胞のみが p75NTR クラスターを発現し周囲には KRT14 細胞がレイヤーをつくり外周に KRT13 細胞がレイヤーを形成した。正常上皮では KRT14 細胞が分化して KRT13 細胞に転化すると考えられている

Snail 発現により EMT が誘導される際は SLC39A で認めたとように上皮プロジェニターマーカーを検索したところ p75NTR が発現消失することが判明した。MET では上皮リネージの再獲得が必須であると考えられ、OM1 細胞における上皮分化を分化マーカー KRT14, 13 を用いて検討した。多くの口腔扁平上皮癌細胞株の遺伝子発現を検索した中で、OM1 のみが KRT14 と KRT13 遺伝子、そして p75NTR 遺伝子を恒常発現していた。増殖する OM1 を細胞免疫染色したところ、細胞単位では KRT14 と KRT13 いずれかのみを発現することが判明した。また上皮プロジェニターマーカー p75NTR を発現する細胞は数%のみ散在し、通常細胞膜に均一局在する p75NTR は特徴的なラフト様クラスターを形成していた。単細胞からのコロニー形成で上皮リネージ形成を検討したところコロニーは中心の数細胞のみが p75NTR クラスターを発現し周囲には KRT14 細胞がレイヤーをつくり外周に KRT13 細胞がレイヤーを形成した。正常上皮では KRT14 細胞が分化して KRT13 細胞に転化すると考えられているが、OM1 コロニーで観察された P75NTR+ プロジェニター、KRT14 リネージ、KRT13 リネージのヒエラルキーにおいては KRT14 発現細胞が非対称分裂により KRT13 発現細胞を生む像が多数観察された。



さらに、Snail 発現は EMT 誘導のみならず、OM1 の p75NTR 依存的な上皮プロジェニターキャラクターを奪い、代わりにネスチン発現を付与することで神経系プロジェニターキャラクターをもたらす知見も得られた。以上、本研究成果として SLC39A ファミリーによる EMT-MET 制御機構および MET における p75NTR + プロジェニター細胞依存的な上皮リネージ維持機構を同定できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 R Uetsuki, K Higashikawa, S Okuda, N Yamakado, F Ishida, A Rizqiawan, S Ono, M Takechi, K Mizuta, H Shigeishi, N Kamata, K Tobiume	4. 巻 -
2. 論文標題 The squamous cell carcinoma cell line OM-1 retains both p75-dependent stratified epithelial progenitor potential and cancer stem cell properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics 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） なし	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 該当する
1. 著者名 Yokoyama S, Shigeishi H, Murodumi H, Sakuma M, Kato H, Higashikawa K, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M	4. 巻 50
2. 論文標題 TGF-1 induces amoeboid-to-mesenchymal transition of CD44high oral squamous cell carcinoma cells via miR-422a downregulation through ERK activation and Cofilin-1 phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Pathol Med	6. 最初と最後の頁 155-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jop.13113	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, 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 282196-2836
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naruse T, Ohta K, Kato H, Ishida Y, Shigeishi H, Sakuma M, Fukui A, Nakagawa T, Tobiume K, Nishi H, Takechi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Immune response to cytosolic DNA via intercellular receptor modulation in oral keratinocytes and fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Dis	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） 10.1111/odi.13725	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 Kubozono K, Mizuta K, Fujimoto S, Tran TT, Kamata N, Tobiume K.	4. 巻 529
2. 論文標題 Dysferlin-deficient myotubes show tethering of different membrane compartments characterized by TMEM16E and DHPR .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 720-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.079	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 該当する

1. 著者名 Kanamoto T, Sakaue H, Kitaoka Y, Asaoka R, Tobiume K, Kiuchi Y.	4. 巻 45
2. 論文標題 D-Alanine Is Reduced by Ocular Hypertension in the Rat Retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Eye Res	6. 最初と最後の頁 490-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1666995	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 Kanamoto Takashi, Tachibana Takashi, Kitaoka Yasushi, Hisatomi Toshio, Ikeda Yasuhiro, Murakami Yusuke, Tobiume Kei, Asaoka Ryo, Kiuchi Yoshiaki	4. 巻 2019
2. 論文標題 Effect of Ocular Hypertension on D- -Aspartic Acid-Containing Proteins in the Retinas of Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/2431481	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東川晃一郎、植月 亮、石田扶美、重石英生、島末 洋、小野重弘、武知正晃
2. 発表標題 口腔癌におけるEMTが付与する治療抵抗性の解析
3. 学会等名 第64回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植月亮、東川晃一郎、重石英生、石田扶美、小野重弘、島末 洋、武知正晃
2. 発表標題 口腔癌細胞における癌幹細胞特性とSnail誘導性EMTの関連性解析
3. 学会等名 第64回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植月 亮，東川晃一郎，重石英生，石田扶美，小野重弘，島末 洋，武知正晃
2. 発表標題 舌癌由来細胞株OM-1における分化転換能の解析
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
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	飛梅 圭 (Kei Tobiume) (40350037)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	
研究 分担者	東川 晃一郎 (Koichiro Higashikawa) (80363084)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	

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