

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19206

研究課題名（和文）放射線耐性を導く口腔がん幹細胞におけるSIRT6の役割

研究課題名（英文）The role of SIRT6 in oral cancer stem cells leading to radiation tolerance

研究代表者

関原 和正（Sekihara, Kazumasa）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所がん生物学部・任期付研究員

研究者番号：20761662

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）：口腔がんにおけるSIRT6の発現と放射線感受性について調査するとともに、治療抵抗性の原因の一つとして考えられるがん幹細胞におけるSIRT6の役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。口腔がん（OSCC）患者から採取された組織サンプルを用いた実験により、OSCC組織ではタンパク質レベルでもmRNAレベルにおいても正常組織と比較して、SIRT6の発現が有意に高いことが分かった。また、細胞株を用いた実験により、SIRT6の発現が放射線治療の効果を抑制していることが分かった。このことから、効果的な放射線治療を目指すうえで、SIRT6が治療標的になりえるのではないかと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、SIRT6発現が放射線治療抵抗性に関わっているのではないかと示唆された。SIRT6阻害が放射線感受性に及ぼす影響についてさらなる検討が必要ではあるが、口腔がんに対するより効果的な放射線治療戦略を考える上で、本研究がその基盤になると思われる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between SIRT6 expression and radiosensitivity in oral cancer and aimed to clarify the role of SIRT6 in cancer stem cells, which is one of the potential mechanisms responsible for treatment resistance. Experiments using tissue samples from oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients revealed that SIRT6 expression was significantly higher in OSCC tissue than in normal tissue, both at the protein and mRNA levels. Experiments using cell lines also showed that SIRT6 expression suppressed the effect of radiotherapy. This suggests that SIRT6 may be a potential therapeutic target for effective radiotherapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：SIRT6 口腔がん がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の口腔がん罹患数は年々増加しつつある。口腔がんにおける標準治療は手術療法であるが、近年放射線療法や化学療法を含めた集学的治療により成績は向上しつつある。しかし再発・転移を認めた場合、治療選択肢は著しく制限され、根治的な治療がないのが現状である。その原因として、治療抵抗性を示すがん幹細胞が化学療法、放射線療法後に残存し再発や転移に寄与するだけでなく、変異を蓄積しより悪性度の高い性質を獲得する可能性が示唆されている。

SIRT6 は脱アセチル化酵素の一つでヘテロクロマチンを制御することが知られ、DNA-PK を介して DNA 修復に関与する。また近年幹細胞恒常性の維持に関わることが分かってきた。SIRT6 はがんにおいて抑制的と促進的な二つの異なる役割が指摘されているが、前者は MYC などのがん促進因子の阻害により、後者は FOXO3 などの cell cycle の促進や IL-8 などのサイトカインの発現上昇によって炎症性反応や血管新生などの微小環境変化を起こし、転移などの悪性度を上昇させることが指摘されている。そこで本研究では PLDR 阻害状況下での SIRT6 の活性と、がん幹細胞における SIRT6 の役割の変化について解析を行う。

2. 研究の目的

口腔がんにおける SIRT6 の発現と放射線感受性について調査するとともに、治療抵抗性の原因の一つとして考えられるがん幹細胞における SIRT6 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 患者組織サンプルにおける SIRT6 の発現

術前補助療法を行わなかった口腔がん (OSCC) 患者から生検または外科手術で採取された組織サンプルを用いた。

免疫染色

採取されたサンプルからパラフィン包埋切片を作製した。作製したスライドに対し、キシレンとエタノールを用いて脱パラフィン処理と再水和を行った。抗原の脱マスクング後、3% H₂O₂ の添加により内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、抗 SIRT6 ウサギモノクローナル抗体を用いて 4℃ で一晩インキュベートした。サンプルに対し、二次抗体を用いてインキュベートした後、ヘマトキシリンで染色した。切片をマウンティングし、顕微鏡で観察した。

SIRT6 発現の陽性シグナルは、以下の基準に従って半定量的にスコア化した (0、染色なし、1、弱い染色から普通の染色、2、中程度から強い染色)。5つの異なる部位をランダムに選択し、スコアの平均を SIRT6 陽性率として表示した。

Real-Time qRT-PCR

High Pure FFPE RNA isolation kit を用いて、パラフィン包埋サンプル (腫瘍サンプルおよび非がんサンプル) から Total RNA を抽出・精製し、Super Script IV VILO Master Mix を用いて、cDNA を作製した。SIRT6 遺伝子の発現は、TaqMan® システムを用いて解析した。正規化には、ヒトハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現を用いた。qRT-PCR は、ABI 7900HT RealTime System で行い、閾値のサイクル (Ct) を得るように計算した。OSCC と非がん部の相対発現量は比較 Ct (Ct_{OSCC} - Ct_{non}) 法により算出し、相対発現倍率 (2^{-(Ct_{OSCC} - Ct_{non})}) は RQ Manager を用いて算出した。健常者の mRNA 発現量を 1 とし、OSCC 患者の mRNA 発現量を正規化し、OSCC 患者の fold change を求めた。

マイクロアレイ

RNeasy kit を用いて、パラフィン包埋サンプル (腫瘍サンプルおよび非がんサンプル) から Total RNA を抽出した。MacroGen Inc. の DNA マイクロアレイ受託解析サービスを用いて、遺伝子発現プロファイル解析を行った。遺伝子レベルの SST-RMA 解析で結果をエクスポートし、差次的発現遺伝子 (DEG) 解析を行った。遺伝子発現の統計的有意性は、fold change を用いて判定した。DEG セットについて、完全連鎖とユークリッド距離を類似性の指標とした階層的クラスタ分析を行った。遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) において、Gene Ontology と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) を用いて解析を実施した。

2. 口腔がん細胞株における SIRT6 の発現と放射線感受性に対する影響

ヒト口腔がん細胞株 HSC-3、SAS からタンパク抽出を行い、immunoblot で SIRT6 の発現を確認した。siRNA を用いて SIRT6 をノックダウンした細胞と対照群としてノックダウンしていない細胞を用いて、X線の抗腫瘍効果を検証した。また、SIRT6 特異的阻害剤 OSS_128167 および pan-sirtuin 阻害剤 Sirtinol を用いて同様の実験を行った。加えて、口腔がん治療に用いられる代表的な抗がん剤であるシスプラチン (CDDP) の感受性にも影響を与えるかどうかも調べた。

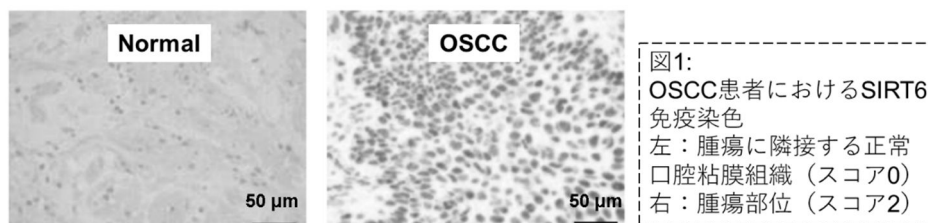
4. 研究成果

1. 患者組織サンプルにおける SIRT6 の発現

免疫染色

免疫染色した組織サンプルのうち 90%以上で SIRT6 タンパク陽性であった。SIRT6 発現の強度解析を行ったところ、SIRT6 陽性のうちスコア 2 で示される SIRT6 の過剰発現が約半数、スコア 1 が約半数であった。腫瘍に隣接する正常口腔粘膜組織では、いずれの症例においても SIRT6 タンパク質の過剰発現は観察されなかった。このことから、OSCC における SIRT6 の過剰発現は、正常口腔粘膜のそれよりも有意に高いということがわかった。

図1

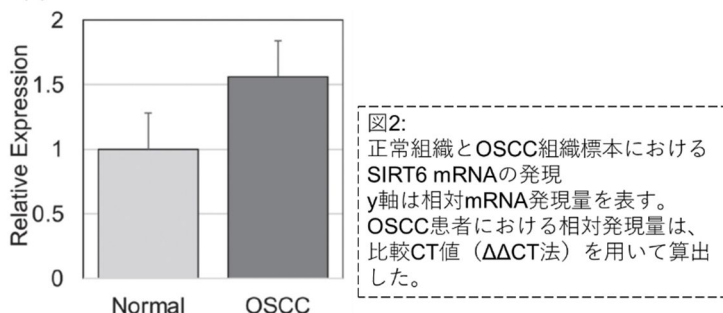


Yoshii H et al. Anticancer Res 2022; 42:3815-3823 改変

Real-Time qRT-PCR

同様に Real-Time qRT-PCR 法を用いて、SIRT6 の遺伝子発現量を測定したところ、タンパク質レベルと一致して、SIRT6 の mRNA 発現レベルも OSCC 組織では正常組織よりも高かった（図 2）。

図2



Yoshii H et al. Anticancer Res 2022; 42:3815-3823

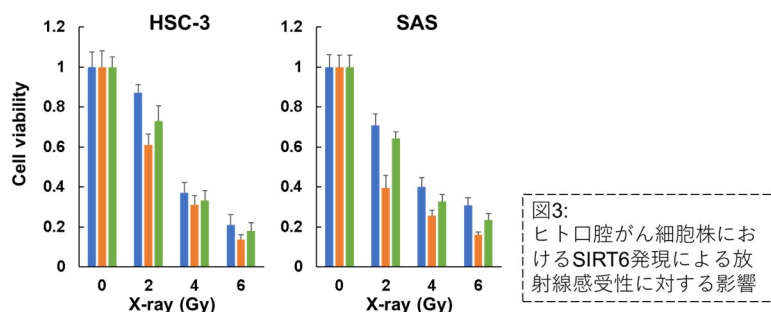
マイクロアレイ

包括的な遺伝子発現プロファイリングアプローチを用いて、OSCC 組織標本を用いてマイクロアレイ解析を行った。OSCC における遺伝子発現を、各個人における一対の非がん個体と比較して解析した結果、いくつかの SIRT6 関連分子が同定された（1.5 倍以上の変化）。OSCC では、癌抑制遺伝子 BRCA2 の転写調節に関わる ANXA2 が有意に発現上昇し、PIGC と RGD4 が発現低下した。

2. 口腔がん細胞株における SIRT6 の発現と放射線感受性に対する影響

まず immunoblot 法でヒト口腔がん細胞株 HSC-3、SAS で SIRT6 の発現を確認できたので、2 種類の SIRT6 siRNA で SIRT6 をノックダウンした細胞と対照群として control siRNA を処理した細胞に 0, 2, 4, 6 Gy の X 線を照射し、照射 4 日後の細胞生存率を CCK-8 assay で測定した。HSC-3 および SAS どちらにおいても SIRT6 をノックダウンすることで X 線の抗腫瘍効果を増強した（図 3：未発表データ）。また阻害剤を用いた実験においても同様の結果となったことから、SIRT6 発現が放射線治療効果を抑制しているということが示唆された。

図3



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 2件）

1. 著者名 NAKAYAMA HIROTAKA, SAITO NAO, KASAJIMA RIKA, SUGANUMA NOBUYASU, RINO YASUSHI, MASUDO KATSUHIKO, YAMAZAKI HARUHIKO, TODA SOJI, SEKIHARA KAZUMASA, IWASAKI HIROYUKI, HOSHINO DAISUKE	4. 巻 43
2. 論文標題 Validation of EZH2 Inhibitor Efficiency in Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1073-1077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.16252	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 Sekihara Kazumasa, Himuro Hidetomo, Saito Nao, Ota Yukihide, Kouro Taku, Kusano Yohsuke, Minohara Shinichi, Hirayama Ryoichi, Katoh Hiroyuki, Sasada Tetsuro, Hoshino Daisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of X-ray and carbon-ion beam irradiation with chemotherapy for the treatment of cervical adenocarcinoma cells in 2D and 3D cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell International	6. 最初と最後の頁 391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12935-022-02810-9	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 星野 大輔, 齋藤 菜緒, 関原 和正	4. 巻 40(4)
2. 論文標題 オルガノイドを用いた個々の患者に対する薬剤効果予測系の確立 - 特集 バイオマテリアルを三次元で創る・視る・使う	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオマテリアル = Journal of Japanese Society for Biomaterials : 生体材料	6. 最初と最後の頁 312-317
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 YOSHII HARUKA, SEKIHARA KAZUMASA, IDETA YUKA, NAKAJIMA SHINTARO, KATO IKUMA, OKUBO-SATO MAKIKO, SUGIURA KEI, MITSUDO KENJI, KIOI MITOMU	4. 巻 42
2. 論文標題 The Expression of SIRT6 Is Associated With Treatment Outcome in Elder Patients With Oral Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3815-3823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15872	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 Toda Soji, Sato Shinya, Saito Nao, Sekihara Kazumasa, Matsui Ai, Murayama Daisuke, Nakayama Hiroataka, Suganuma Nobuyasu, Okubo Yoichiro, Hayashi Hiroyuki, Iwasaki Hiroyuki, Miyagi Yohei, Hoshino Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 TROP-2, Nectin-4, GPNMB, and B7-H3 Are Potentially Therapeutic Targets for Anaplastic Thyroid Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 579 ~ -579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030579	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 齋藤菜緒, 平山亮一, 星野大輔
2. 発表標題 子宮頸部腺がん治療における重粒子線治療の優位性
3. 学会等名 第9回がん代謝研究会 in松山
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 平山亮一, 笹田哲朗, 星野大輔
2. 発表標題 悪性腫瘍 (放射線、抗がん剤に抵抗性を示す難治がん含む) に対する重粒子線の有用性および分子機構の解明
3. 学会等名 2022年度重粒子線がん治療装置等共同利用研究成果報告会 (録画発表)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 齋藤菜緒, 星野大輔
2. 発表標題 3D培養における低酸素誘導治療抵抗性を重粒子線により打破する
3. 学会等名 第2回若手放射線影響研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 齋藤菜緒, 太田幸秀, 星野大輔
2. 発表標題 二次元および三次元培養された子宮頸部腺癌に対するX線および重粒子線の効果
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第 35回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 齋藤菜緒, 太田幸秀, 笹田哲朗, 星野大輔
2. 発表標題 子宮頸部腺がん三次元スフェロイドにおける炭素線照射の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関原和正, 中島慎太郎, 星野大輔, 來生知
2. 発表標題 骨髓細胞の流入と口腔癌幹細胞による治療抵抗性の分子機構
3. 学会等名 第8回がんと代謝研究会 in 佐渡
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関原和正, 氷室秀知, 齋藤菜緒, 太田幸秀, 星野大輔
2. 発表標題 二次元および三次元培養における子宮頸部腺がんの放射線感受性評価
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関原和正, 來生知
2. 発表標題 CD11b陽性骨髓細胞の流入と口腔癌幹細胞による治療抵抗性の分子メカニズム
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関原和正, 中島慎太郎, 來生知
2. 発表標題 治療抵抗性を誘導する骨髓細胞の流入と口腔癌幹細胞の分子メカニズム
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019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

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