

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10138

研究課題名(和文) CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞におけるメカノトランスダクション機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanotransduction mechanisms in oral squamous cell carcinoma cells with high CD44 expression

研究代表者

重石 英生 (Shigeishi, Hideo)

広島大学・医系科学研究科(歯)・講師

研究者番号：90397943

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)：アクチン細胞骨格を制御するCofilin-1は、CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能に関与していた。また、TGF- β 1はCofilin-1のリン酸化とERK1/2の活性化を介したmiR-422a発現の抑制により、amoeboid-to-mesenchymal transitionを誘導した。Cofilin-1とmiR-422は amoeboid-like CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞の維持に重要な役割を持つことが明らかとなった。さらに、miR-224-5pはPANX1によるATPの放出を抑制することにより、ドセタキセルにより誘導されるアポトーシスの抵抗性に関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

amoeboid-like CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞は、高い浸潤能を持つことから、腫瘍の再発や転移に関与している可能性が示唆された。さらに、amoeboid-like CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞は、口腔扁平上皮癌における抗がん剤抵抗性に関与していると予測されるため、amoeboid-like CD44高発現口腔扁平上皮癌細胞におけるアポトーシ回避機構を解明することが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cofilin-1, an intracellular actin-modulating protein, was involved in the invasive capacity of CD44high OSCC cells. TGF- β 1 induced amoeboid-to-mesenchymal transition by Cofilin-1 phosphorylation and downregulation of miR-422a via ERK activation. Our findings suggest that miR-422a and Cofilin-1 play major roles in the maintenance of amoeboid-like CD44high cells. Furthermore, miR-224-5p plays a vital role in the resistance to docetaxel-induced apoptosis by attenuating PANX1-induced ATP discharge.

研究分野：外科系歯科学

キーワード：癌幹細胞 CD44 アポトーシス抵抗性 メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌細胞における epithelial-mesenchymal transition (EMT) と癌幹細胞形質の関連性を検討するため、CD44 と ESA をマーカーとして、口腔扁平上皮癌細胞株から、線維芽細胞様形態を示す CD44^{high}/ESA^{low} 細胞と上皮細胞様形態を示す CD44^{high}/ESA^{high} 細胞を分離し、研究を行った。その結果、両細胞とも腫瘍形成能を示し、特に、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は、Vimentin や Snail などの EMT 関連遺伝子を高発現しており、高い遊走能とコロニー形成能を示すことが明らかとなった (Shigeishi et al. Stem Cells, 2013)。CD44^{high}/ESA^{low} 細胞は、数週間培養後に親細胞の表現形を再現したことから、間葉系細胞が mesenchymal-epithelial transition (MET) により上皮系細胞を生じ、腫瘍の heterogeneity を再構成すると考えられた。

(2) 活性化型 GSK3β は CD44^{high}/ESA^{low} 細胞の自己複製に関与することが明らかとなった (Shigeishi et al. J Oral Pathol Med. 2015)。また、CD44^{high}/ESA^{low} 細胞が産生する内因性 PGE2 は、CD44^{high}/ESA^{high} 細胞のアポトーシス抵抗性に関係していた (Shigeishi et al. Int J Clin Exp Pathol, 2018)。

(3) CD44^{high}/ALDH1^{high} 細胞は間葉形質を示し、ALDH1 活性の維持に活性化型 GSK3β が必要であることを明らかとした (Seino and Shigeishi et al. J Oral Pathol Med. 2016)。このことから、CD44^{high} 細胞において GSK3β は ALDH1 の酵素活性を維持することにより、口腔扁平上皮癌の幹細胞形質および間葉形質の維持に重要な役割を持つと考えられた。

(4) 生体組織の弾性率にほぼ近い状態を再現するため、ハイドロゲル (弾性率: 0.1kPa ~ 50 kPa) をラミニン 332 にてコーティングした培養ディッシュを作成した。口腔扁平上皮癌細胞株 OM-1 を用いて、CD44 高発現細胞をソーティングした後、ハイドロゲル上で培養したところ、50kPa のハイドロゲル上では上皮細胞様形態を示し、4.0kPa のハイドロゲル上では線維芽細胞様形態を示す細胞 (Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞) に変化した。さらに、1.0kPa のハイドロゲル上では Amoeboid 様形態を示す細胞 (Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞) に変化した。このことから、CD44 高発現口腔癌細胞では、足場の弾性率の変化により、mesenchymal to amoeboid transition (MAT) および amoeboid to mesenchymal transition (AMT) が生じることが示された (図 1) (Shigeishi et al. Int J Clin Exp Pathol, 2019)。さらに、microarray 解析の結果より、Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞では Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞と比較して Cofilin-1 が高発現しており、アクチン細胞骨格を制御する Cofilin-1 が Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞の維持に必要であることが予測された。

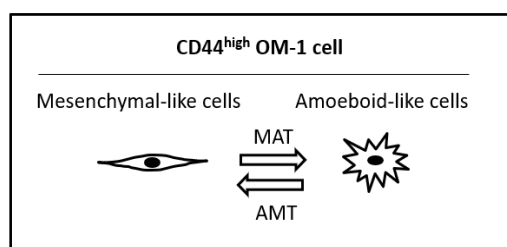


図 1. CD44 高発現口腔癌細胞における MAT および AMT

以上より、メカノトランスダクションが CD44 高発現口腔癌細胞の癌幹細胞形質に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

口腔癌において、自己複製能と分化能をもつ癌特異的な幹細胞が存在し、腫瘍の再発や転移に関与している可能性がある。我々は、幹細胞形質を有する CD44 高発現口腔癌細胞が細胞外基質や足場の弾性率の変化により、線維芽細胞様形態や Amoeboid 様細胞に変化することを明らかとした。本研究においては、これまでの成果をさらに発展させ、シリコンゲルやハイドロゲルを用いた 2 次元培養法により、周囲の微小環境やメカニカルストレスにより制御される、口腔扁平上皮癌幹細胞に特有な分化やアポトーシスの調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞 OM-1 を用いて FACS にてソーティングを行い、CD44 高発現口腔癌細胞を用いて実験を行った。CD44 高発現細胞における癌幹細胞形質（幹細胞マーカー遺伝子の発現、アポトーシス抵抗性、浸潤能など）を明らかとするため研究を行った。

(1) Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞における AMT の制御機構について

ラミニン 332 をコーティングした 2.0-kPa の低弾性率のシリコンゲルを用いて、FACS にてソーティングした CD44 高発現口腔癌細胞を培養したところ、細胞は Amoeboid 様形態を示した。Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞における Cofilin の役割と AMT の制御メカニズムについて検討を行った。さらに、TGF-β1 により発現が誘導される microRNA についてマイクロアレイを用いて解析を行った。

(2) Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞におけるアポトーシス抵抗性の獲得機構について

ラミニン 332 をコーティングした 32-kPa のシリコンゲルを用いて、CD44 高発現口腔癌細胞を培養したところ、線維芽細胞様形態を示す Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞を認めた。また、ラミニン 332 をコーティングしたプラスチックディッシュ上では、上皮細胞様形態を示す Epithelial-like CD44 高発現口腔癌細胞を認めた。Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞、Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞、Epithelial-like CD44 高発現口腔癌細胞において、ドセタキセルにより誘導されるアポトーシスを FACS にて解析した。さらに、細胞死については ALDH cytotoxic assay により検討した。また、膜タンパク質である Pannexin1 (Panx1) とアポトーシスとの関係について検討した。

(3) Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞におけるアポトーシス抵抗性の獲得機構について

フィブロネクチンをコーティングしたハイドロゲルを用いて、CD44 高発現口腔癌細胞を培養したところ、CD44 高発現口腔癌細胞は線維芽細胞様形態を示した。また、フィブロネクチンをコーティングしたプラスチックディッシュ上では、CD44 高発現口腔癌細胞は上皮細胞様形態を示した。メラトニンが小胞体膜タンパク質である Derlin-1 (DERL1) の発現やシスプラチンにより誘導されるアポトーシスに及ぼす影響について検討した。

4 . 研究成果

(1) Cofilin-1 の Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞における役割

Cofilin-1 は、CD44 高発現口腔癌細胞の核内に発現を認めた。Cofilin-1 ノックダウンにより CD44 高発現口腔癌細胞の浸潤能が低下したことから、Cofilin-1 は浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。また、TGF-β1 は、Cofilin-1 のリン酸化と ERK1/2 の活性化を介した miR-422a 発現の抑制により、AMT を誘導することが明らかとなった（図 2）。このことから、Cofilin-1 と miR-422 は、Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞の維持に重要な役割を担うと考えられた（Yokoyama and Shigeishi et al. J Oral Pathol Med, 2021）。以上の結果から、Cofilin-1 は、口腔扁平上皮癌の高度悪性化機構に関与している可能性が示唆された。

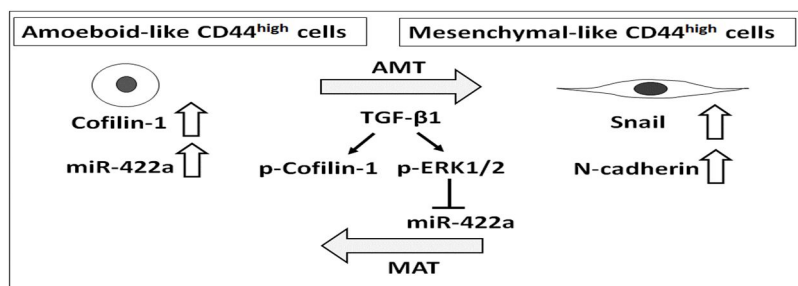


図 2 . Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞における TGF-β1 による AMT 誘導

(2) Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞のアポトーシス抵抗性の獲得機構

Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞は、ドセタキセルにより誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を示し、miR-224-5p の高発現を示した（Yokoyama and Shigeishi et al. Eur J Oral Sci, 2021）。さらに、Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞において、miR-224-5p は PANX1 による ATP の放出を抑制することにより、ドセタキセルにより誘導されるアポトーシスの抵抗性に関与していた。このことから、Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞は、miR-224-5p を介して膜タンパク質である PANX1 の発現を抑制することにより、アポトーシス抵抗性を獲得すると考えられた。

(3) Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞のアポトーシス抵抗性の獲得機構

Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞では、Epithelial-like CD44 高発現口腔癌細胞と比較して、幹細胞マーカー（Sox2, Oct4, Nanog, ALDH1）の mRNA 発現が上昇していた（Shigeishi et al.

J Oral Pathol Med, 2022)。また、Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞は小胞体膜タンパク質である DERL1 を高発現しており、メラトニンは DERL1 の発現を抑制することにより、シスプラチンにより誘導されるアポトーシスを増強させることが明らかとなった。

以上より、Amoeboid-like CD44 高発現口腔癌細胞は、高いアポトーシス抵抗性や浸潤能を有し、口腔癌の治療抵抗性や再発・転移に深く関与していると予測された。また、癌幹細胞形質を有す Mesenchymal-like CD44 高発現口腔癌細胞において、特異的なアポトーシス回避機構の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

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 Journal of Oral Pathology & Medicine	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 Yokoyama S, Shigeishi H, Murodumi H, Sakuma M, Ono S, Tobiume K, Sugiyama M, Ohta K, Takechi M.	4. 巻 129
2. 論文標題 Effects of miR-224-5p-enhanced downregulation of PAX1 on docetaxel-induced apoptosis in amoeboid-like CD44high oral cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 e12812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12812	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, Fukada S, Okuda S, Yamakado N, Ono S, Takechi M, Ohta K.	4. 巻 51
2. 論文標題 Melatonin enhances cisplatin-induced cell death through inhibition of DERL1 in mesenchymal-like CD44high OSCC cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Pathology & Medicine	6. 最初と最後の頁 281,289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jop.13242.	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
研究分担者	小野 重弘 (Ono Shigehiro) (70379882)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (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
---------	---------