

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09841

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の間質浸潤と側方上皮内進展：その相反的制御と分子基盤

研究課題名(英文) Stromal invasion and lateral migration of oral squamous cell carcinoma: reciprocal regulation and molecular basis

研究代表者

阿部 達也 (Abe, Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70634856

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)：口腔扁平上皮癌(OSCC)の上皮内進展先進部で高発現を認めたladinin-1(LAD1)の上皮内進展と間質浸潤の相互制御可能性について詳細な検討を行うこととした。LAD1発現抑制を行ったOSCC培養細胞株を材料に、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現検討、コラーゲンゲル上培養における浸潤度と分子発現検討、LAD1発現抑制下での定量的細胞形態評価、公開データベースの検討から、LAD1がOSCC細胞の上皮性格の維持に関与し、発現が減弱することで間質浸潤能が増加する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌は粘膜上皮内に発生し、上皮内を進展する段階を経て、間質浸潤をきたすことで、悪性腫瘍としての性質を獲得する。上皮内進展と間質浸潤はそれぞれ患者予後の観点からは決定的に異なる現象であり、それらを相反的に制御する分子が存在している可能性が見出されたことは、今後の制癌的治療戦略や予防的アプローチに寄与する可能性のある結果といえる。

研究成果の概要(英文)：The functional analysis of ladinin-1 (LAD1), which was found to be highly expressed in the intraepithelial extension of oral squamous cell carcinoma, revealed the possibility that LAD1 is associated with actin molecules and regulates the migration of cancer cells. We investigated the relationship between the expression of LAD1, the extent of invasion of cancer cells on collagen gels, the quantitative morphological evaluation of cultured cells under the suppression of LAD1 expression, and clinicopathological factor analysis by public database search. LAD1 may contribute to maintaining the epithelial character of oral squamous cell carcinoma cells, and its reduced expression may increase its ability to invade the stroma.

研究分野：病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 LAD1

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は口腔粘膜組織内に発生したのち、上皮内進展および間質浸潤によってその大きさ・範囲を拡大させていく。これまで癌の発育・進展という観点では、間質浸潤の重要性が大きくフォーカスされ、上皮内進展に注目されることは少なかったが、申請者らはこれまでに口腔扁平上皮癌の上皮内進展界面で高発現する laminin-1 (LAD1) が、癌の上皮内進展を正に、間質浸潤を負に、それぞれ制御している可能性を見出した。この現象に癌細胞のアクチン分子動態や中間径フィラメントの発現調整が、WNT non-canonical pathway を介して行われている可能性が示唆されたことから、LAD1 を基軸とし、癌細胞の側方上皮内進展・間質浸潤のメカニズムを細胞骨格分子制御の観点から解明することを計画した。口腔癌の側方進展・間質浸潤に特異的な細胞現象の解明から、病理組織診断における浸潤現象の客観化だけでなく、癌の浸潤抑制という治療技術としての展開を臨床現場にトランスレーショナルにフィードバックできる基礎研究を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では、「LAD1 の発現は、癌の垂直浸潤と側方進展を制御する主要因子である」という仮説を検証し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

申請者はこれまで口腔扁平上皮癌組織を分子発現の面から視覚化を試み、これらの知見を応用することで、癌-非癌界面には細胞競合の指標となるアポトーシスが亢進すること、また組織材料を用いたタンパク質網羅的解析 (Abé T. *Exp Mol Pathol.* 2017) により、癌界面に特異的に発現するタンパク質の多くがアクチン分子の重合・脱重合制御に関連している可能性を見出したと同時に、特に注目されたタンパク質である LAD1 が癌細胞のアクチン分子制御とともに、平面的遊走と垂直的遊走を相反的に制御していることを明らかにした。これらの独自視点・解析から得た知見をさらに詳細に検討することを主目的とした。

癌の間質浸潤と側方上皮内進展は、癌の疾患としての発育・進展や患者予後を考えるうえで重要な項目である。癌細胞がいくら上皮内を進展していても、間質浸潤をきたさなければ転移することはなく、生命予後は良好に保たれる。したがって、本研究の推進より、癌の発育・進展を、より詳細に捉えることが可能となり、直近の成果として予後に直結する癌の進展をより客観的に病理学的に診断する手法へのフィードバックが可能となると考えられた。

3. 研究の方法

i. LAD1 発現抑制細胞における網羅的遺伝子発現解析およびタンパク質発現評価

これまでの検討により、siRNA 法で発現抑制を行った LAD1 抑制口腔扁平上皮癌細胞は、水平的細胞遊走の抑制と垂直的細胞遊走の促進という相反する遊走能の変化を認めている。同時に、予備実験で、LAD1 抑制細胞では WNT5a の発現上昇とともに、vimentin の発現亢進と、keratin 14 や keratin 19 などの発現減少が認められたことから、LAD1 発現抑制が、アクチン分子制御のみならず上皮間葉転換 (EMT) に関連した中間径フィラメント発現変動を介し、側方遊走・垂直遊走の 2 面的制御に重要な役割を果たす可能性が示された。そこで、LAD1 抑制口腔扁平上皮癌細胞株およびコントロール条件のそれぞれの細胞における、RNA sequencing (RNA-seq) を行い、transcriptome 解析を行うことで、LAD1 発現変動に伴う包括的な遺伝子発現プロファイルを把握することとした。

ii. 口腔扁平上皮立体培養系を用いた側方進展・垂直浸潤解析

癌細胞をコラーゲン基質上に培養し、培養平面に垂直な組織切片を作製することで、癌の垂直浸潤を評価すること。LAD1 発現を抑制した細胞とコントロールの細胞を、それぞれ個別にコラーゲン基質上に播種し、一定期間培養を行った後に、固定・包埋を行い、薄切標本を作製し、HE 染色による垂直的浸潤の評価を行う。薄切標本では、免疫組織化学を併用し、LAD1 抑制細胞で細胞遊走への関連が予想される分子について検討を行う。

iii. LAD1 発現抑制細胞における細胞形態の定量的評価

LAD1 発現抑制細胞の細胞形態評価を行うために、細胞内の F-actin を蛍光標識したうえで、蛍光写真を取得し、これらの細胞形態を画像解析ソフト (Fiji; cellpose; FracLac) にて定量解析を行った。

iv. 臨床検体公開データベース解析による LAD1 発現の意義の探索

The Cancer Genome Atlas (TCGA) による臨床検体公開データを用いた LAD1 高発現群と低発現群における予後や病理組織所見との関連性を評価した (cBioportal を併用)。

4. 研究成果

i) LAD1 抑制細胞とコントロール細胞を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析では、biclust 解析において種々の遺伝子の有意な発現変動を認め、これらの遺伝子の Gene ontology 解析を行うと細胞遊走能および細胞接着性に関連するパスウェイにエンリッチメントを認め、LAD1 の発現変動が細胞の遊走能に重要な因子であることが再確認される結果であった。ただし、これまでに認められた WNT pathway に関連する因子の発現は限定的であり、LAD1 の発現抑制下における WNT pathway の関連性は大きくない可能性が示唆された。一方、今回使用した LAD1 抑制のための siRNA において、複数の種類を用いたが、用いた製品シーケンスによって表現型に差がみられた。これらの原因を検討するために、ロングリードシーケンスによるトランスクリプトームおよびアイソフォーム解析を併用したが、明確な要因を同定するにはいたらなかった。

ii) LAD1 抑制細胞とコントロール細胞をそれぞれ、I 型コラーゲンゲル上に播種し、薄切標本を作製して細胞のコラーゲンゲルへの浸潤度を評価すると、LAD1 抑制条件下においてコラーゲンゲル中への浸潤深さの有意な増加が認められた。また、薄切標本において免疫染色を施行したところ、LAD1 発現抑制細胞の浸潤先進部において vimentin の陽性と E-cadherin 陽性像が不完全化する所見が認められ、これらの所見からは LAD1 の発現減弱が、浸潤癌細胞の collective invasion または partial epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関連している可能性が示唆された。この現象は過去の課題 (18K09550) で得られた LAD1 発現抑制下における EMT 関連遺伝子変動とも符合すると考えられた。そのなかでも、WNT5A のシグナル抑制のための候補として、ROR2 遺伝子発現の抑制を試行したが、特異的 siRNA の十分な効果が確認できず、実験に用いることは困難であった。

iii) これまでの検討により LAD1 はアクチン分子との関連性があることが示されており、仮足

形成に変調が生じることが予想されたことから、LAD1 抑制条件下での癌細胞の形態変化を定量的に評価した。細胞形態の評価には、アクチン分子を蛍光色素によりラベルして取得した細胞蛍光画像を用い、細胞形態を自動的に同定・セグメンテーションし、アウトラインを自動同定したうえで、アウトラインのフラクタル次元を数値化することで、定量的に細胞輪郭の複雑性を評価したところ、LAD1 の発現抑制細胞で、細胞形態の複雑性が増す可能性があることが示された。この結果は、病理形態学的観点からは、LAD1 非抑制細胞がより上皮性の性格を有し、LAD1 抑制細胞がより間質細胞に類似した形態を示している可能性があることを示唆するものであった。

iv) TCGA 公開データベースを用いた解析で、頭頸部扁平上皮癌のデータセットを用いて、RNA-seq の結果より LAD1 高発現群と低発現に分け、予後や臨床病理学的因子との関連性を評価したところ、LAD1 高発現群では扁平上皮癌の組織学的グレードが低い傾向があることが明らかとなった。扁平上皮癌の組織学的グレード分類は、病理組織学的な癌の分化度に基づいて決定されており、高分化であるほどグレードが低く評価される。したがって、LAD1 高発現群は、低発現群に比べて、分化度が高い、すなわち扁平上皮のとしての分化が亢進していることが示された。

これまでの検討結果とその追試結果を追加し、上記の所見を総合すると、LAD1 は扁平上皮癌における上皮性格の維持に関連し、LAD1 の発現が高い場合には、癌は上皮としての特徴を有し、上皮内を進展しやすい傾向を持つことが示唆された。一方で、LAD1 発現が減弱した場合には、上皮としての性格が完全ではないまでも減弱し、間質との親和性の高い形態・分子発現を示すことで、間質浸潤をきたしやすくなる可能性が示唆された。これらの結果は英文誌に投稿し、査読中である (2024 年 6 月 21 日現在)。今回の研究においては、詳細な制御機構まで解明するには至らなかったことから、今後のさらなる検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 阿部達也、山崎学、丸山智、河原田壮史、Nyein Nyein Chan、北野太一、田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるIadinin-1 の上皮性格維持および間質浸潤制御機能
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部達也、山崎学、丸山智、Nyein Nyein Chan、田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるIadinin-1と細胞極性・上皮性格制御
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部達也、山崎学、丸山智、河原田壮史、ニェインニェインチャン、味岡洋一、田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における Iadinin-1: 細胞遊走極性と上皮-間葉転換
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部達也、山崎学、丸山智、田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における Iadinin-1 の細胞遊走および上皮-間葉転換制御機能
3. 学会等名 第17回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部達也, 山崎学, 丸山智, 田沼順一
2. 発表標題 口腔平上皮癌における上皮-間葉転換制御と上皮内進展・間質浸潤
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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	山崎 学 (Yamazaki Manabu) (10547516)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
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
---------	---------