

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10092

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における細胞老化-老化細胞除去誘導療法の基盤構築

研究課題名(英文) Construction of bases to develop senescence-senolysis induction therapy for oral squamous cell carcinoma

研究代表者

今井 智章 (Imai, Tomoaki)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80599598

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)：多様なストレスにさらされた細胞が不可逆的な増殖停止に至る細胞老化は発癌防御機構である一方、老化細胞は微小環境で慢性炎症を惹起し、発癌や悪性進展化を促進する形質(SASP)を示す。本研究の目的は、口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株およびマウス実験モデルを用いて、抗癌剤シスプラチン(CDDP)による細胞老化マーカーおよびSASP因子の分子生物学的動態を解析する。舌癌マウス組織とOSCC細胞株へのCDDP処理によるp21発現上昇を伴う細胞老化が認められた。p21阻害剤添加実験により、p21介在性誘導の細胞老化が、SASP因子の分泌を促進していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌(OSCC)に対する薬物療法はシスプラチン(CDDP)が主体である。薬剤抵抗性に至ったOSCCによる細胞老化の分子生物学的な解明は、OSCCの悪性形質の分子機構の理解のみならず、臨床面においては切除不能な進行再発癌や多発性癌、転移性癌に対する抗腫瘍薬物療法の成績向上への新たな足掛かりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Senescence is a protective process against the development of cancer, when cells that are subjected to different stimuli stop growing permanently. Senescent cells trigger persistent inflammation in the surrounding area and display characteristics that encourage the development of cancer and the advancement of malignancy (known as SASP).

This study aimed to examine the molecular dynamics of senescence indicators and SASP components triggered by the anticancer drug, cisplatin (CDDP), in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines and animal experimental models.

CDDP treatment resulted in the observation of senescence with elevated p21 expression in tongue cancer mouse tissues and OSCC cell lines. The application of p21 inhibitors showed that p21-induced senescence stimulates the release of SASP factors.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会のわが国では悪性腫瘍をはじめとした加齢関連疾患の罹患者が増え、分子病態として細胞老化 (senescence) が注目されている。過酷な外部刺激にさらされる口腔粘膜において、DNA 損傷を受けた細胞はアポトーシスで死滅するか細胞老化により不可逆的な細胞周期の停止に至る。一方、細胞老化を回避あるいは逸脱した上皮細胞が、口腔扁平上皮癌 (OSCC) へ形質転換しうる。細胞老化に至った細胞 (老化細胞) は発癌、悪性形質を促進する起炎性因子を分泌する形質 (senescence-associated secretory phenotype: SASP) を示す。

細胞老化の経路として、p16 や p21 が知られている。そして、細胞老化はがん薬物療法においても誘発される。すなわち、不均一かつ不完全な応答性により薬剤耐性の癌細胞が残存し、さらに、老化細胞の SASP により癌細胞の生存に適した微小環境が提供されることが、消化器系癌では示されている。しかし、OSCC を対象とした研究は乏しいのが現状である。

OSCC に対する薬物療法はシスプラチン (CDDP) が主体である。薬剤抵抗性に至った OSCC による細胞老化の分子生物学的な解明は、OSCC の悪性形質の分子機構の理解のみならず、臨床面においては切除不能な進行再発癌や多発性癌、転移性癌に対する抗腫瘍薬物療法の成績向上への新たな足掛かりになると考えられる。

2. 研究の目的

OSCC 細胞株およびマウス実験モデルを用いて、OSCC における CDDP による細胞老化マーカーおよび SASP 因子の分子生物学的動態を解析する

3. 研究の方法

(1) OSCC 細胞株および培養方法

実験にはマウス口腔扁平上皮癌細胞由来の細胞株、NR-S1 細胞を使用した。細胞を 37℃, 5% CO₂ 気相下において、10% ウシ胎児血清 (FBS: Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA) および 100µg/ml カナマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, 日本) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium Ham 's F-12 培地 (D-MEM Ham 's F-12: 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で培養し、実験を行った。

(2) 担癌マウスへの CDDP 投与実験

全ての動物実験は事前に大阪大学大学院歯学研究科内動物実験委員会の審査を受け、承認を得た。5~6 週齢の雄性 C3H マウス (日本 SLC, 静岡, 日本) に、ミダゾラム (4.0 mg/kg 体重, Dormicum®: アステラス製薬株式会社, 東京, 日本) メドミジン (0.3 mg/kg 体重, Domitor®: 日本全薬工業株式会社, 東京, 日本) プトルファノール (5.0 mg/kg 体重, Vetorphale®: Meiji Seika ファルマ株式会社) の 3 種混合麻酔を行った。NR-S1 細胞 (1 × 10⁶/100µl) を細胞培養液で懸濁し、100µl を舌尖中央に接種した。腫瘍の形成、増大を確認した後、CDDP (シスプラチン注 10mg, 日医工株式会社, 富山, 日本) を 10mg/20ml の濃度で、尾静脈より 1 回につき 200µl、一週間おきに計 2 回投与した。対照群には、同じタイムコースで生理食塩水を投与した。最終投与より 3 日後に腫瘍を摘出した。

(3) 免疫細胞染色による評価

免疫細胞染色は、12 Well Chamber, removable (IBIDI GMBH, Munchen, Germany) に培養した細胞をメタノールで固定、透過処理を行った後、PBS で洗浄し、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で 30 分ブロッキングした後、スライドを抗 p21 抗体 (1:200, bioss) で 4℃ にて 12 時間反応させた。PBS で洗浄し、Rhodamine-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch LABORATORIES, INC, Pennsylvania, USA) を 200 倍に希釈し、室温遮光下で 1 時間反応させた。最後にスライドを DAPI Fluoromount-G 封入剤 (SouthernBiotech, AL, USA) で封入した。

(4) OSCC 細胞株の CDDP 処理実験

NR-S1 細胞株を 6well dish に 50%~70% コンフルエントになるよう培養し、その培養液中に 20 µM の CDDP を添加し 6 時間処理した。CDDP を除去して、通常の培養液で培養した後、RNA を回収した。なお、培養時間は、0 時間、24 時間の 2 群とした。

細胞免疫染色の準備として、12 Well Chamber, removable に NR-S1 細胞株を約 24 時間培養し、20 µM の CDDP で 6 時間処理した。CDDP を除去し、通常の培養液で 24 時間培養した後、細胞免疫染色を行った。

(5) OSCC 細胞株の CDDP ならびに p21 阻害剤処理実験

NR-S1 細胞株を 6well dish に 50%~70%コンフルエントになるよう培養し、20 μ M の CDDP のみを添加した培地と、20 μ M の CDDP に加え、DMSO で希釈した 10 μ M の p21 阻害剤 UC2288 (Selleck Biotech, 東京, 日本) を添加した培地を作成し、それぞれ 6 時間処理した。上清を除去して、通常の培養液で 24 時間培養した後、RNA を回収した。

細胞免疫染色の準備として、12 Well Chamber, removable に NR-S1 細胞株を約 24 時間培養し、20 μ M の CDDP のみを添加した培地と、20 μ M の CDDP に加え、DMSO で希釈した 10 μ M の p21 阻害剤 UC2288 を添加した培地を作成し、それぞれ 6 時間処理した。上清を除去して、通常の培養液で 24 時間培養した後、免疫細胞染色を行った。

(6) 遺伝子発現の評価

培養細胞および組織からの RNA 抽出は、total RNA isolation system (Monarch Total RNA Miniprep Kit : New England Biolabs, MA, USA) を使用した。First-strand cDNAs は、ReverTraAce® qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社, 大阪, 日本) を使用して合成した。定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法は、SYBR Green PCR プロトコルと StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, NJ, USA) を使用して、1 サンプルにつき n=3 として実施した。なお、増幅に使用した SYBR Green プライマーを表に示す (表 1)。

(7) 統計分析

実験結果データは、*in vitro* 実験の平均 \pm SD および *in vivo* 実験の平均 \pm SEM としてそれぞれ提示した。独立した 2 群の比較は Student's t 検定を、関連ある 2 群の比較は Paired t 検定を、2 \times 2 分割表の検定は Fisher's exact probability 検定を使用し、3 群間の比較は一元配置 ANOVA と Dunnett の多重比較検定を使用して評価した。統計学的に解析は Prism 9 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用した。p 値は 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 担癌マウスの舌腫瘍組織並びに、OSCC 細胞株への CDDP 処理による p21 発現上昇を伴う細胞老化

前述の通り、近年、癌薬物療法による腫瘍細胞の細胞老化が注目されている。そこで、CDDP 投与により腫瘍細胞に細胞老化が生じているかどうかを確認するために、マウス舌腫瘍から抽出した RNA を用いて、細胞老化マーカーとして知られる細胞周期調節因子である p16 および p21 の発現を RT-qPCR 法により評価した。すると CDDP 投与群では対照群と比較し、p21 の有意な発現上昇を認めた (図 1A)。しかし、p16 に関しては、両群間に有意差は認めなかった (図 1B)。

次に、NR-S1 細胞の CDDP 処理実験を行った。その結果、CDDP 処理により、p21 の mRNA レベルでの発現量は上昇し、CDDP 処理終了後 24 時間経過した群でその発現量は最も上昇した (図 1C)。タンパク質レベルでの p21 の発現量変化を検討するために、CDDP 処理後 24 時間経過した NR-S1 細胞を用いて細胞免疫染色を行った。その結果、コントロールと比較し、CDDP 処理を行った細胞では、核と細胞質で p21 の高発現を認めた (図 1D)。

(2) OSCC 細胞株への CDDP 処理による SASP 因子等の発現変化

代表的な SASP 因子である IL-6、IL-13、CXCL9、CXCL1、CXCL2、CCL2、CCL5 について、CDDP 処理による mRNA レベルでの発現解析を行った。qPCR の結果、いずれの SASP 因子においても、CDDP 処理直後は、発現量が一旦低下するが、CDDP 処理終了後 24 時間経過したものは、コントロールと比較して有意な発現上昇を認めた (図 2)。代表的な SASP 因子の発現上昇は、CDDP による癌細胞の細胞老化を裏付ける結果となった。

(3) OSCC 細胞株への CDDP 並びに p21 阻害剤処理による細胞老化マーカーと SASP 因子等の発現変化

OSCC 細胞株への CDDP 処理による細胞老化が p21 を介した現象であることを確かめるために p21 阻害剤である UC2288 の添加実験を行った。CDDP 処理した NR-S1 細胞に UC2288 を添加することにより、mRNA レベルでの p21 発現量は有意に低下し、UC2288 で p21 の発現が阻害されていることを確認した (図 3A)。さらに、細胞免疫染色でタンパク質レベルでの解析を行ったところ、CDDP のみで処理した細胞と比較し、CDDP と UC2288 で処理した細胞では p21 発現低下を認めた (図 3B)。

次に、前述の OSCC 細胞株への CDDP 処理により発現が上昇した SASP 因子等のうち、特に腫瘍関連マクロファージとの関連が報告されている CCL2、CCL5、IL-13 の発現上昇が、癌細胞

の細胞老化によるものかどうかを検討するために UC2288 の添加によるこれらの mRNA レベルでの発現変化を検討した。その結果、CDDP のみで処理した細胞と比較し、UC2288 の添加により CCL2、CCL5、および IL-13 の有意な発現低下を確認した（図 3C）。これらの結果は、CDDP により、p21 の発現を介して誘導された口腔癌細胞の細胞老化が、CCL5 をはじめとする SASP 因子の分泌を促進していることを示している。

表 1

RT-qPCR 法で増幅に使用した SYBR Green プライマーの一覧

Gene name	Sequence (5' → 3')
p21	Forward CCTGGTGTGTCGACCTG
	Reverse CCATGAGCGCATCGCAATC
p16-INK4a	Forward CGCAGGTTCTTGGTCACTGT
	Reverse TGTTACAGAAAGCCAGAGCG
IL-6	Forward CCTGAGACTCAAGCAGAAATGG
	Reverse AGAAGGAAGGTCGGCTTCACT
CXCL1	Forward ACTGCACCCAAACCGAAGTC
	Reverse TGGGGACACCTTTTAGCATCTT
CXCL2	Forward CCAACCACAGGCTACAGG
	Reverse GCGTCACACTCAAGCTCTG
CCL2	Forward TTA AAAACCTGGATCGGAACCAA
	Reverse GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
CCL5	Forward GCTGCTTGCCTACCTCTCC
	Reverse TCGAGTGACAAACACGACTGC
CXCL9	Forward TCCTTTGGGCATCATCTTCC
	Reverse TTTGTAGTGGATCGTGCTCG
IL-13	Forward CCTGGCTCTTGCTTGCCTT
	Reverse GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA

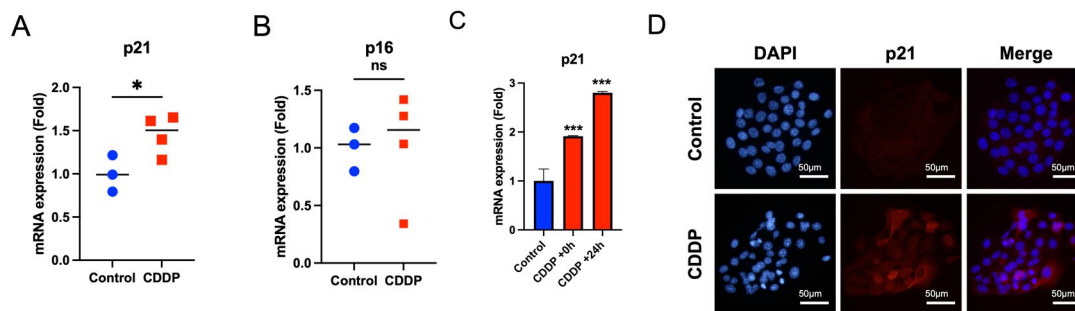


図 1 CDDP による細胞老化マーカーおよび SASP 因子等の変化

(A) マウス舌腫瘍組織における p21 の mRNA 発現量を示す。対照群と比較して、CDDP 投与群では、有意な p21 の発現上昇を認めた。(B) マウス舌腫瘍組織における p16 の mRNA 発現量を示す。有意差は認めない。(A)(B)各遺伝子発現量は GAPDH の発現量で補正し、Saline 群の発現量の倍数で示した。値は平均値および中央値を示す。* : $p < 0.05$ 。コントロール群 $n=3$ 、CDDP 投与群 $n=4$ 。(C)CDDP 処理を行った培養 Sq1979 細胞における mRNA レベルでの p21 の発現量変化を示す。CDDP 処理により、p21 の mRNA レベルでの発現量は上昇し、CDDP 処理終了後 24 時間経過した群でその発現量は最も上昇した。遺伝子発現量は GAPDH の発現量で補正し、対照群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。 $n=3$ 。(D)CDDP 処理による培養 Sq1979 細胞における p21 発現の免疫細胞染色による評価。Control と比較し、CDDP 処理した Sq1979 細胞で、細胞質および核において p21 の高発現を認めた。赤色 : p21、青色 : DAPI。スケールバー : 50 μm 。

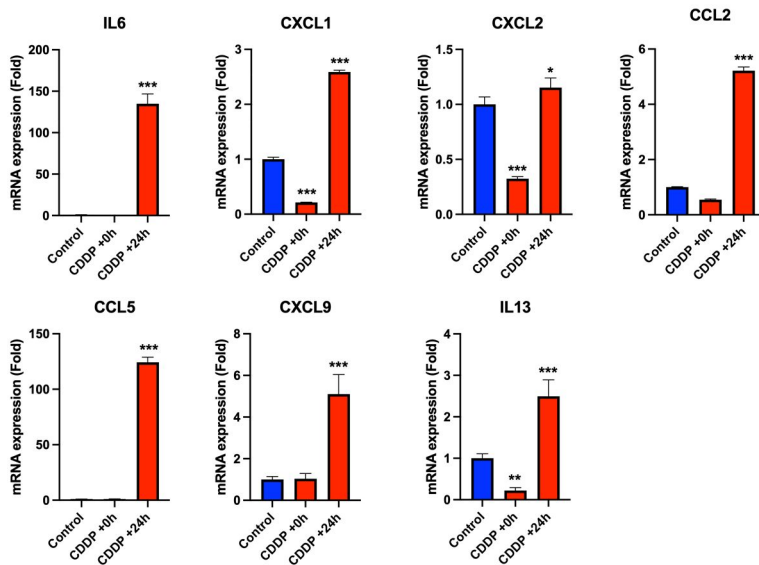


図2 培養 Sq1979 細胞の CDDP 処理による SASP 因子等の発現変化

CDDP 処理を行った培養 Sq1979 細胞における mRNA レベルでの IL-6、CXCL1、CXCL2、CCL2、CCL5、CXCL9 および IL-13 の発現量変化を示す。代表的な SASP 因子 (IL-6、CXCL1、CXCL2、CCL2、CCL5) は、24 時間経過で、コントロールと比較して有意な発現上昇を認めた。CXCL9、IL-13 発現についても、同様の結果を認めた。各遺伝子発現量は GAPDH の発現量で補正し、対照群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。n=3。

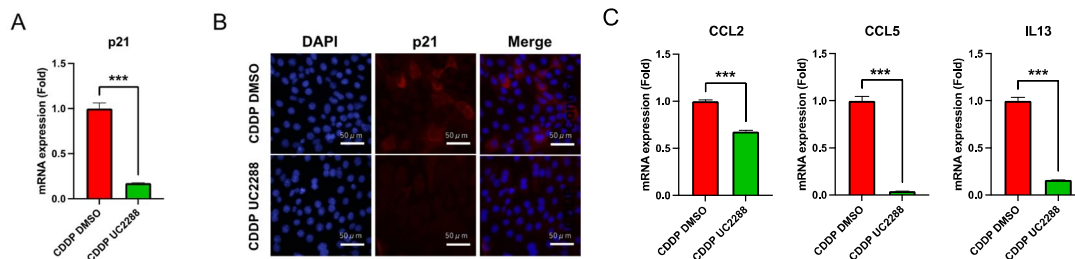


図3 CDDP 処理培養 Sq1979 細胞への p21 阻害剤添加による細胞老化マーカーおよび SASP 因子等の変化

(A) CDDP 処理した Sq1979 細胞に p21 阻害剤 UC2288 を添加した際の mRNA レベルでの p21 発現量の変化を示す。UC2288 添加で p21 の発現量は有意に低下した。遺伝子発現量は GAPDH の発現量で補正し、CDDP+UC2288 群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*** : $p < 0.001$ 。n=3。

(B) 免疫細胞染色による p21 発現の評価。CDDP 処理単独と比較し、CDDP 処理 Sq1979 細胞への UC2288 添加で、p21 発現が抑制された。赤色 : p21、青色 : DAPI。スケールバー : 50 μm 。

(C) CDDP 処理した Sq1979 細胞に UC2288 を添加した際の mRNA レベルでの CCL2、CCL5、IL-13 の発現変化を示す。UC2288 の添加により、有意な発現低下を認めた。各遺伝子発現量は GAPDH の発現量で補正し、CDDP+DMSO 群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。n=3。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shun Takayama, Yoshihiro Morita, Ayano Nishimoto, Junya Nishimura, Katsuki Takebe, Satoko Kishimoto, Yuka Matsumiya-Matsumoto, Kazuhide Matsunaga, Tomoaki Imai, Narikazu Uzawa	4. 巻 144
2. 論文標題 GATA6 regulates expression of annexin A10 (ANXA10) associated with epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 105569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2022.105569.	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 Junya Nishimura, Yoshihiro Morita, Ayano Tobe-Nishimoto, Yukiko Kitahira, Shun Takayama, Satoko Kishimoto, Yuka Matsumiya-Matsumoto, Akinori Takeshita, Kazuhide Matsunaga, Tomoaki Imai, Narikazu Uzawa	4. 巻 136
2. 論文標題 CDDP-induced desmoplasia-like changes in oral cancer tissues are related to SASP-related factors induced by the senescence of cancer cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 112377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2024.112377	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村 遵也 森田 祥弘 西元 彩乃 高山 峻 北平 有紀子 岸本 聡子 松宮 由香 今井 智章 鷺澤 成一
2. 発表標題 口腔癌細胞は癌薬物療法により老化現象が起こりSASP関連因子を発現する
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西元 彩乃 森田 祥弘 西村 遵也 高山 峻 岸本 聡子 松宮 由香 武部 克希 今井 智章 鷺澤 成一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移における腫瘍関連マクロファージの検討
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山峻 森田祥弘 西元彩乃 西村遵也 武部克希 今井智章 鶴澤成一
2. 発表標題 GATA6は口腔扁平上皮癌の上皮間葉転換 (EMT) に関与している
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下彰範 松永和秀 加藤逸郎 今井智章 森田祥弘 松宮由香 千田正 梶川ひとみ 武部克希 鶴澤成一
2. 発表標題 当科における術後再発転移高リスク症例への対応の実際
3. 学会等名 第40 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野祥夫 今井智章 竹下彰範 鶴澤成一
2. 発表標題 口底頬皮/頬表皮嚢胞摘出術における術式選択アルゴリズムの提案
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・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	森田 祥弘 (Morita Yoshihiro) (30590517)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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