

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592963

研究課題名(和文) ヒト唾液腺腫瘍における RHAMM 遺伝子の発現及び機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of RHAMM in human salivary gland carcinomas

研究代表者

重石 英生 (SHIGEISHI, HIDEO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90397943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌において RHAMM の発現は癌細胞の増殖能と関連していた。また、CD44 高発現を示す唾液腺癌細胞および口腔扁平上皮癌細胞から間葉系細胞の性質を示し、高い遊走能をもつ細胞集団(CD44high/ESALow)と上皮様形態を示し、高い増殖能をもつ細胞集団(CD44high/ESAhigh)の二つの phenotype を分離した。この二つの細胞集団はともに癌幹細胞形質を有し、CD44high/ESAhigh 細胞の holoclone 形成には RHAMM が必要であることが明らかとなった。このことから、RHAMM が頭頸部癌幹細胞の自己複製に重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In head and neck cancers, elevated expression of RHAMM was associated with high proliferation of cancer cells. In addition, we demonstrated that there were two biologically different cancer stem cell (CSC) phenotypes of salivary gland carcinoma and oral squamous cell carcinoma, one of which is CD44high/epithelial specific antigen (ESA) low cells, which have mesenchymal characteristics and are migratory, while the other phenotype is CD44high/ESAhigh cells, which have epithelial properties and high proliferative capacity, and harbor increased RHAMM expression. Since RHAMM is required for holoclone forming of CD44high/ESAhigh cells, it appears that it has a role in the self-renewal ability of head and neck CSC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：RHAMM 唾液腺癌 口腔扁平上皮癌 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の中でも、唾液腺癌の組織像および分化度は多彩であり、唾液腺癌の分子生物学的な特徴は不明な点が多い。ヒアルロン酸の受容体として同定された蛋白質である RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility) は、細胞内シグナル伝達や細胞周期 M 期の紡錘体形成において重要な役割を担う遺伝子である。我々は唾液腺癌において、細胞周期の進行に関わる TPX2 遺伝子の発現が RHAMM の発現と相関していることを明らかとした。このことから、RHAMM が唾液腺癌において、腫瘍の増殖に関与することが示唆された。

### 2. 研究の目的

唾液腺癌および口腔扁平上皮癌における RHAMM の発現および機能を明らかにすることを目的とした。さらに、癌幹細胞の存在は癌の悪性化に深く関与していると考えられる。そのため頭頸部癌細胞を用いて癌幹細胞の同定を行い、癌幹細胞における RHAMM の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

唾液腺癌細胞において RHAMM の siRNA ノックダウンを行い、細胞増殖能、細胞遊走能の変化を検討した。

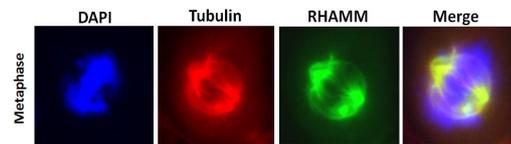
CD44 と ESA (epithelial specific antigen) をマーカーとして、唾液腺癌細胞及び口腔扁平上皮癌細胞を用いて FACS (fluorescence activated cell sorting) 解析を行い、CD44 高発現細胞から線維芽細胞様形態を示す細胞集団 (CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>) と上皮様形態を示す細胞集団 (CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>) の二つの phenotype を分離し、その性状を解析した。さらに、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞と CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞における RHAMM の発現および機能を解析した。

CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞と CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞における Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) の発現および機能を解析した。

### 4. 研究成果

唾液腺癌細胞において RHAMM は細胞周期 M 期の紡錘体において高発現を示した (図 1)。さらに RHAMM をノックダウンした唾液腺癌細胞や口腔扁平上皮癌細胞は、細胞増殖能や遊走能が顕著に低下した (J Cancer Res Clin Oncol, 2014)。この結果から、RHAMM は細胞周期の進行を制御し、癌細胞の増殖に重要な役割を持つことが明らかとなった。

図1. 唾液腺癌細胞におけるRHAMMの蛍光免疫染色



CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞と比較して Vimentin や Snail などの EMT 関連遺伝子が高発現しており、間葉系細胞の性質を持ち、高い遊走能を示した。一方、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞は E-cadherin の高発現と高い増殖能を示した。Sphere-forming assay では、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は高いコロニー形成能を有していた。この結果より、EMT 形質を示す CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は高い自己複製能をもつと考えられた。さらに CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞をシングルセルクローニングすると、数週間培養後に約半数のクローンで CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞が生じ、最終的には親細胞の表現形を認めた (Stem Cell, 2013)。これらの現象から、同じ遺伝子型をもつ癌細胞集団内で間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) が生じ、上皮形質を持つ細胞と間葉形質を持つ細胞がサブポピュレーションを形成して腫瘍組織を再構築することが考えられた。

さらに、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞は RHAMM を高発現しており、RHAMM siRNA ノックダウンにより、holoclone 形成が抑制された。このことから、RHAMM が CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞の holoclone 形成に必要なことが明らかとなった (Stem Cell, 2013)。以上より、RHAMM が上皮様形態を示す頭頸部癌幹細胞の自己複製に重要な役割を担うことが示唆された。

CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞の Sphere コロニー形成は、GSK3β をノックダウンすることによって有意に減少し、活性化型 GSK3β が自己複製に必要なことが示唆された (Stem Cell, 2013)。さらに CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞の MET が GSK3β のノックダウンによって促進されることから、活性化型 GSK3β は CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞の MET を抑制し、自己複製を促進する方向に働くと考えられた (図 2)。以上より活性化型 GSK3β が頭頸部癌幹細胞の形質表現において重要な役割を持つことが明らかとなった。

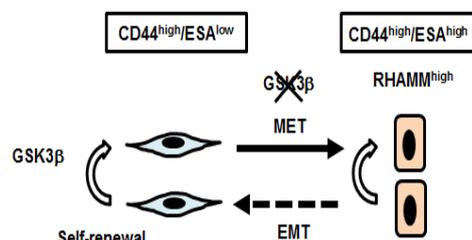


図2. 頭頸部癌幹細胞におけるGSK3βによる自己複製とMETの調節

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Shigeishi H, Higashikawa K, Takechi M. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014.(印刷中) doi: 10.1007/s00432-014-1653-z (査読有)
2. 重石 英生、東川 晃一郎、奥井 岳、小野 重弘、太田 耕司、武知 正晃、杉山 勝、鎌田 伸之. 口腔扁平上皮癌における癌幹細胞の特性 (総説); 日本口腔組織培養学会誌, 22(2),1-6, 2013. (査読有)
3. Rizqiawan A, Tobiume K, Okui G, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Takechi M, Higashikawa K, Kamata N. Autocrine galectin-1 promotes collective cell migration of squamous cell carcinoma cells through up-regulation of distinct integrins. *Biochem Biophys Res Commun*. 29;441(4):904-910, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.152. (査読有)
4. Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, Emich H, Rodini CO, Gemenetzidis E, Fazil B, Sugiyama M, Kamata N, Mackenzie IC. Maintenance of Stem cell Self-renewal in Head and Neck Cancers Requires Actions of GSK3 $\beta$  Influenced by CD44 and RHAMM. *Stem Cells*. 31(10):2073-2083, 2013. doi: 10.1002/stem.1418. (査読有)
5. Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Higashikawa K, Kamata N. AKT primes Snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cells. *J Cell Biochem*. 114(9):2039-2049, 2013. doi: 10.1002/jcb.24545. (査読有)
6. Tanaka F, Rizqiawan A, Higashikawa K, Tobiume K, Okui G, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Kamata N. Snail promotes Cyr61 secretion to prime collective cell migration and form invasive tumor nests in squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 28;329(2):243-252, 2013. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.023. (査読有)
7. Increased telomerase activity and hTERT expression in human salivary gland carcinomas. Shigeishi H, Sugiyama M, Tahara H, Ono S, Kumar Bhawal U, Okura M, Kogo M, Shinohara M, Shindoh M, Shintani S, Hamakawa H, Takata T, Kamata N. *Oncol Lett*. 1;2(5):845-885, 2011. doi: 10.3892/ol.2011.354 (査読有)
8. Hatano H, Shigeishi H, Kudo Y, Higashikawa Y, Tobiume K, Takata T, Kamata N. RHAMM / ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR. *Lab Invest*. 91(3):379-391, 2011. doi: 10.1038/labinvest.2010.176. (査読有)
9. Shigeishi H, Higashikawa K, Hatano H, Okui G, Tanaka F, Tran TT, Rizqiawan A, Ono S, Tobiume K, Kamata N. PGE<sub>2</sub> targets squamous cell carcinoma cell with the activated epidermal growth factor receptor family for survival against 5-fluorouracil through NR4A2 induction. *Cancer Lett*. 28;307(2):227-236, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.04.008. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 口腔扁平上皮癌細胞における幹細胞形質と GSK3 $\beta$ の関わり: 重石 英生、奥井 岳、小野 重弘、Andra Rizqiawan、東川 晃一郎、

杉山 勝, 鎌田 伸之. 第67回NPO法人日本  
口腔科学会学術集会 (2013年5月24日、栃木)

2. Role of galectin 1 in cell migration and  
invasiveness in human squamous cell carcinoma  
correlated with EMT:ANDRA RIZQIAWAN,  
飛梅 圭、奥井 岳、山本 一博、東川 晃  
一郎、重石 英生、小野 重弘、鎌田 伸之.  
第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会  
(2013年5月24日、栃木)

3. Rondini C, Fazil B, Emich H, Bidle A,  
Gammon L, Gmmenezidis E, Shigeishi H,  
Mackenzie C. Relevance of EMT in vitro models  
for OSCC invasion studies. IADR 90th General  
Session, March 21-24, 2012. Brazil.

4. CD44-related molecular events underline the  
choice between self-renewal and differentiation  
of cancer stem cells in SCC: Hideo Shigeishi,  
Koichiro Higashikawa, Shigehiro Ono, Masaru  
Sugiyama, Nobuyuki Kamata. 第 71 回日本癌学  
会学術総会(2012年9月19日、札幌)

5. 口腔扁平上皮癌幹細胞における CD44 関連  
シグナル伝達経路の役割: 重石 英生、奥井  
岳、小野 重弘、東川 晃一郎、杉山 勝、  
鎌田 伸之. 第 49 回日本口腔組織培養学会  
学術大会 (2012年11月17日、広島)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号 : 90397943

### (2)研究分担者

鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号 : 70242211  
(平成 23 年度 ~ 平成 25 年度 6 月)

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)

広島大学・病院・講師

研究者番号 : 80363084

小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号 : 70379882