

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 9 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670802

研究課題名(和文) エントーシスを応用した癌幹細胞へのオートファジー細胞死の誘導

研究課題名(英文) Autophagy-mediated cell death in cancer initiating cells of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

大野 純 (Ohno, Jun)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10152208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)における癌幹細胞の検出と細胞ストレスによる口腔扁平上皮癌のオートファジー死の誘導について検討した。ALDH1陽性OSCCは、癌幹細胞としての特性を有し、臨床材料では再発に関与することが明らかとなった。ConA刺激OSCC細胞は、ConAを細胞内に取り込んでオートファジーが誘導され、アポトーシスに陥った。この結果は、ConA刺激によりOSCCはオートファジー死が誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined characteristics of ALDH1 positive oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and autophagy-mediated apoptosis in OSCC cells. The clinicopathological results showed that elevated ALDH1 expression correlated with local recurrence. In in vitro experiments, the percentage of cells exhibiting ALDH1 enzymatic activity significantly increased among cisplatin-survival cells, suggesting that ALDH1 expression contributes to the characteristics of cancer initiating cells in OSCC. HSC-3 treated with ConA showed an internalization of ConA in the cytoplasm and an induction of autophagy. Autophagy-induced HSC-3 showed the high percentage of Annexin V expression and an increased expression of cleaved PARP, cleaved caspase-3, and Bax, known as apoptosis markers, by western blotting assay. From these results, we suggest that ConA-treated OSCC cells induce the autophagy-mediated apoptosis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 ALDH1 cancer initiating cells ConA オートファジー アポトーシス HSC-3

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞と癌幹細胞から分化した癌細胞(分化型癌細胞)に分類することができる。癌幹細胞は、抗癌剤および放射線療法に抵抗性であり、本細胞をターゲットとした治療法が、癌の根絶に重要であることが認識されている。しかしながら、癌胞巣内においても癌幹細胞は分化型癌細胞を利用した生存戦略を確立して、浸潤および転移に準備している可能性がある。生存戦略の2本柱として、1)酸欠などの低栄養状態を回避するためのオートファジー(自食作用)と2)血液供給の確保のため不要とされる分化型癌細胞をcell-in-cell現象で癌幹細胞に取り込み、死滅させるエントーシス(entosis)がある。癌根絶のためには癌幹細胞を標的とした治療法が必要である。したがって、この2つの現象を応用した治療法が確立できれば、癌幹細胞を特異的に、かつ効果的に排除できると考える。

2. 研究の目的

癌幹細胞ならびに分化型癌細胞の根絶法を確立する基礎研究として、1)口腔扁平上皮癌(OSCC)の癌幹細胞[cancer initiating cell (CIC)あるいはcancer stem cell (CSC)]の同定と性状解析、2)OSCC細胞へConA刺激によるオートファジーあるいはエントーシスの誘導、および3)ConA刺激によるオートファジー細胞死の誘導を目的とする。

3. 研究の方法

1)OSCCにおけるCICの同定:OSCC組織標本およびOSCC細胞株でのCIC同定を、免疫染色法およびFACS法により行った。FACS法ではaldefluor assayを用いた。

2)OSCC細胞へのCisplatin (Cis)およびConA刺激:培地内CisおよびConAを添加し、ConAのinternalizationを蛍光法にて検索する。

3)オートファジー検索:オートファジー・マーカーであるLC3およびBeclin-1の細胞免疫染色およびwestern blotting法を行った。

4. 研究成果

本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)でのcancer initiating cells (CIC)あるいはcancer stem cells (CSC)の性状について、aldehyde dehydrogenase 1(ALDH1)の発現により検討した。パラフィン切片による免疫組織化学的検索より、正常粘膜組織はALDH1の陽性所見はみとめなかった。一方、OSCC組織においては、ALDH1が癌胞巣の一部癌細胞に染まるパターンと胞巣を構成する大部分の癌細胞が染色されるものが認められた。これらの染色性を染色Low群とHigh群に分けて、臨床病理学的検索を行った(図1)。

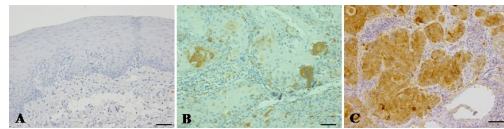


図1 OSCC標本によるALDH1発現様式。A 正常粘膜、B Low群OSCC、C High群OSCC

その結果、High群OSCC症例では局所再発と相関することが明らかとなった。すなわち、ALDH1陽性細胞は腫瘍細胞の中で、癌細胞がもつ特性を細胞群である可能性が示唆された。そこで、in vitro実験を企図した。OSCC cell lineのHSC-3細胞を用いて、Aldefluor assayを行った。ALDH1発現を蛍光顕微鏡およびFACSにより検索した。HSC-3細胞中には、0.62%のALDH1陽性細胞が含まれていた。しかし、同細胞を抗癌剤であるシスプラチン(Cis)で前処理してAldefluor assayを行ったところ、ALDH1陽性率が14.8%まで上昇した。この結果は、ALDH1陽性HSC-3細胞が抗癌剤抵抗性をもつ可能性を示している。そこで、薬剤排出機序に関与するABCG2の発現をwestern blotting法で検索したところ、Cis抵抗性HSC-3細胞はコントロール群と比較して、有意にABCG2発現が亢進した。すなわち、Cis抵抗性はABCG2を介した抗癌剤排出機能を有している可能性が示唆された。さらに、Cis抵抗性細胞は、間質組織への浸潤能が亢進した。これらの結果から、Cis抵抗性でALDH1陽性細胞は、CICである可能性が考えられた。そこで、CICの特性である自己複製能に関して、cancer sphere assayにより検討した。Cis抵抗性HSC-3細胞とコントロールを無血清培地でLow-binding plateに播種して、sphere形成能を調べた。

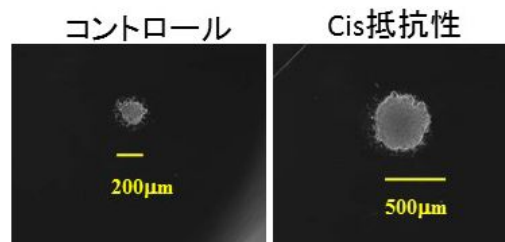


図2 cancer sphere assay

その結果、Cis抵抗性細胞ではコントロール細胞と比較して、大きく形の明瞭なsphereが形成された。

以上の結果から、OSCCにおいてALDH1陽性細胞は、局所再発に関与することが明らかとなった。さらに、OSCC細胞では、ALDH1陽性細胞は機能面から、CICである可能性が示唆された。本研究の成果は、Int J Oncol (2014)に掲載された。

次に、OSCC細胞へのConA刺激によるオートファジーの誘導とその影響について検討した。OSCC組織およびHSC-3細胞でのConA反応性をレクチン組織化学にて検索すると、ConAは組織および細胞ともに、癌細胞の細胞質内に染色された(図3)。

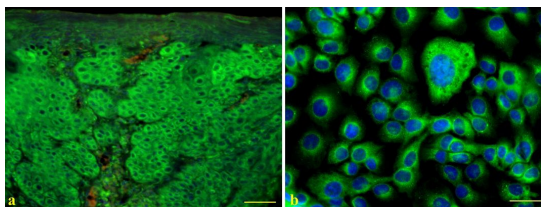


図3 OSCC組織(a)およびHSC-3細胞(b)でのConA発現

ConA を培地内に各濃度で添加すると、HSC-3 細胞は細胞質内に ConA を取り込む internalization が認められた。この internalization により、低濃度添加群 (10 μ g/ml) では HSC-3 細胞の増殖能および遊走能に変化はみられなかった。しかし、高濃度添加群 (40 μ g/ml) においては細胞増殖能および遊走能が抑制された。ConA の HSC-3 細胞への internalization は、MMA 投与により阻害された。

Internalization によるオートファジーの誘導を検索すると、HSC-3 細胞の細胞質にはオートファゴソームが検出された。さらに、western blotting 法によりオートファジーのマーカである LC3-II 発現が認められた。これらの反応は、オートファジー阻害剤である 3-MA 処理により抑制された。したがって、ConA 投与により HSC-3 細胞ではオートファジーが誘導されることが明らかとなった (図4)。

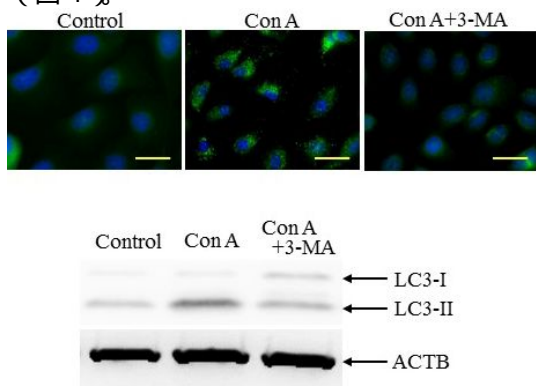


図4 ConA 刺激によるオートファジー誘導

ConA 投与による HSC-3 細胞でのオートファジー誘導は、ConA 濃度に依存的ではなく、低濃度群および高濃度群でも認められた。また、高濃度添加 HSC-3 細胞では、ミトコンドリア・タンパクである BNIP-3 の発現が亢進した。この結果は、高濃度 ConA 刺激が細胞ストレスとなり、ROS 蓄積が推測される。しかしながら、詳細な ConA 刺激によるオートファジー誘導機序に関しては、現時点では不明であり、今後の課題と考える。

高濃度 ConA によりオートファジーが誘導された HSC-3 細胞は、低濃度 ConA 群と比較して、Annexin V 陽性細胞が増加していることが明らかとなった。また、Western blotting 法による検索においても、高濃度 ConA 添加 HSC-3 細胞では Cleaved PARP,

cleaved caspase-3, Bax の発現が促進した。

それに対して、Bcl-2 および Bcl-XL の発現は低下した。この結果は、高濃度 ConA 添加 HSC-3 細胞では、アポトーシスが誘導されることを示唆している。

以上の結果から、高濃度 ConA は HSC-3 細胞でのオートファジーを誘導し、細胞をアポトーシスに導くことが考えられた。

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7件)

Yamaguchi Y, Ohno J*, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol 14:105, 2014. DOI: 10.1186/s12896-014-0150-9.*corresponding author.(査読有)

Toda M, Ohno J*, Shinozaki Y, Ozaki M, Fukushima T. Osteogenic potential for replacing cells in rat cranial defects implanted with a DNA/protamine complex paste. Bone 67: 237-245, 2014.

DOI:10.1016/j.bone.2014.07.018.*corresponding author.(査読有)

Shinozaki Y, Toda M, Ohno J, Kawaguchi M, Kido H, Fukushima T. Evaluation of bone formation guided by DNA/protamine complex with FGF-2 in an adult rat calvarial defect model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 102: 1669-1676, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.33143.(査読有)

Hanada H, Ohno J*, Seno K, Ota N, Taniguchi K. Dynamic changes in cell-surface expression of mannose in the oral epithelium during the development of graft-versus-host disease of the oral mucosa in rats. BMC Oral Health 14:5, 2014. DOI: 10.1186/1472-6831-14-5.*corresponding author.(査読有)

Ota N, Ohno J*, Seno K, Taniguchi K, Ozeki S. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol 44: 435-442, 2014. DOI: 10.3892/ijco.2013.2188. *corresponding author.(査読有)

Seno K, Ohno J*, Ota N, Hirofuji T, Taniguchi K. Lupu-like oral mucosal lesions in mercury-induced autoimmune response in Brown Norway rats. BMC Immunol 14:47, 2013. DOI: 10.1186/1471-2172-14-47. *corresponding author.(査読有)

Mori N, Ohno J, Sakagami R, Hayakawa T, Fukushima T. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 101: 743-751, 2013. DOI: 10.1002/jbm.b.32877. (査読有)

〔学会発表〕(計 7件)

萩尾佳那子、**大野 純**、山口真広、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄 「LPS 刺激によるヒトケラチノサイトでのオートファジー誘導」第 141 回日本歯科保存学会・秋期学術大会 2014 年 10 月 30 日 山形

山口真広、**大野 純**、萩尾佳那子、内藤 徹 「ヒト・ケラチノサイトの酸化ストレスによる細胞老化とオートファジー」第 141 回日本歯科保存学会・秋期学術大会 2014 年 10 月 30 日 山形

萩尾佳那子、**大野 純**、山口真広、廣藤卓雄 「LPS 刺激ケラチノサイトでのオートファジー誘導」第 25 回日本臨床口腔病理学会総会 2014 年 8 月 29 日 新潟

山口真広、**大野 純**、萩尾佳那子、内藤 徹 「マウス口腔メラノーマにおける腫瘍関連マクロファージの分布様式」第 25 回日本臨床口腔病理学会総会 2014 年 8 月 29 日 新潟

瀬野恵衣、**大野 純**、廣藤卓雄、谷口邦久 「オートファジー抑制による口腔扁平上皮癌の cancer sphere 形成能の変化」第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 25 日 広島

瀬野恵衣、**大野 純**、太田信敬、廣藤卓雄、谷口邦久 「オートファジー抑制による cancer sphere 形成能」第 24 回日本臨床口腔病理学会総会 2013 年 8 月 28 日 東京

大野 純、瀬野恵衣、太田信敬、谷口邦久 「オートファジー抑制による口腔扁平上皮癌の動態」第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6 日 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 純 (OHNO, Jun)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：10152208

(2) 研究分担者

川口 稔 (KAWAGUCHI, Minoru)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：10122780

福島 忠男 (FUKUSHIMA, Tadao)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：80084250