

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462617

研究課題名(和文) 頭頸部癌における糖代謝異常と EMT シグナル活性化に伴う癌浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cancer invasion / metastasis mechanism associated with abnormal glucose metabolism and activation of EMT signaling in head and neck cancer

研究代表者

太田 一郎 (Ichiro, Ota)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00326323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：癌細胞における糖代謝異常が癌の進展の大きな要因であることが明らかになりつつある。今回、糖尿病の病態として高血糖状態において癌細胞特異的な糖代謝異常がEMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮間葉移行)を誘導し、癌幹細胞の活性化を促進し、癌の浸潤・転移を亢進させるかどうかを検討した。その結果、高血糖状態では、癌細胞のEMTシグナル活性が亢進し、癌の浸潤転移が亢進することが分かった。さらに、癌幹細胞の活性化にも影響を与えることが示唆された。また、in vivo癌浸潤・転移モデル実験系においても高血糖状態の癌細胞は浸潤・転移を亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Abnormal glucose metabolism in cancer cells is known to be a major factor in cancer development. As a condition of diabetes, we investigated whether carbohydrate-specific carbohydrate metabolism abnormality induced EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) in hyperglycemic state promotes activation of cancer stem cells and enhances cancer invasion and metastasis. In addition, it also suggested that hyperglycemic state could affect the activation of cancer stem cells. Moreover, It was suggested that hyperglycaemic cancer cells have increased invasion and metastasis in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌幹細胞 浸潤・転移 EMT 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌において、これまでの治療の進展により臓器温存を含めて患者の QOL は改善しつつあるものの、生存率の大きな改善に至っていないのが現状である。その死因の多くは局所再発と遠隔転移であり、つまり、いかに癌の浸潤・転移を制御するかが治療の要であると考えられる。

(2) 癌が浸潤・転移していく過程で、上皮の基底膜や周囲の間質を突き破り増殖していくためにはタンパク質分解酵素が必要であり、特にその浸潤・転移のあらゆる局面において Matrix metalloproteinase (MMP) が関与していると言われている (Matrisian LM, et al. J Clin Oncol, 2000)。

我々は、これまでに、とりわけ細胞膜結合型の MMP である MT1-MMP が、癌細胞自身に強発現し、癌細胞の浸潤・転移の直接的な担い手になっていることを報告してきた (Sabeh F, Ota I, et al. J Cell Biol, 2004)。さらに、Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT を誘導することで、MT1-MMP 及び MT2-MMP を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出してきた (Ota I, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2009; Yook JI, Ota I, et al. Nat Cell Biol, 2006; Yook JI, Ota I, et al. J Biol Chem, 2005)。さらに、EMT は、癌の浸潤・転移の Key Factor であるとともに、癌幹細胞の重要な制御因子であることが示唆された。(図 1)

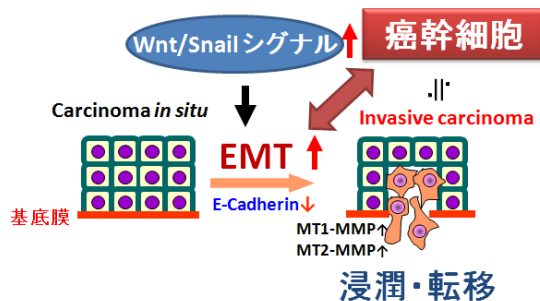


図 1 癌の浸潤・転移のメカニズムと癌幹細胞

(3) 一方、糖尿病と癌の罹患率はともに全世界で急速に増加している。両疾患の発症には多くの遺伝的要因、環境要因が関わっているが、近年、糖尿病が癌のリスク上昇に関与するという疫学研究の報告が認められるようになった。現在、全世界で 3 億 6600 万人が糖尿病に罹患しており、今後その数はさらに増加することが予測されている。また、糖尿病の病態に密接に関連した癌細胞特異的なエネルギー代謝経路の異常が、癌の浸潤転移能の亢進とともに癌の進展に大きな影響を与えることが報告されている (Hanahan D and Weinberg RA, Cell, 2011)。

(4) つまり、糖尿病と癌の進展との関連を明らかにすることは、両疾患の予防や治療のためにも重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では頭頸部癌の治療効果の向上のため、癌細胞の浸潤・転移のしくみを解明し、そのしくみを基に浸潤・転移を阻止することを目的としている。近年、糖尿病が癌のリスクファクターであることが注目されており、癌細胞における糖代謝異常が癌の進展の大きな要因であることが明らかになりつつある。そこで、我々が開発した癌浸潤・転移モデル実験系などを用いて、糖尿病の病態として高血糖状態において癌細胞特異的な糖代謝異常が EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮間葉移行) を誘導し、癌幹細胞の活性化を促進し、癌の浸潤・転移を亢進させるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞における高血糖状態での Wnt、Snail、MT1-MMP の発現、それに伴う EMT の解析、および癌幹細胞の同定とその活性化の解析

A) 生化学的な機能解析

頭頸部扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-1、HSC3、HSC4、SAS など) を用いて、高血糖状態での糖尿病関連遺伝子、Wnt、Snail、E-Cadherin、MT1-MMP などの発現および相互作用を RT-PCR、ウェスタン・プロット、免疫沈降法、レポーターアッセイなどを用いて検討する。また、siRNA によるヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の発現抑制はコントロールを含め、electroporation 法 (Amaxa Biosystems) で細胞内に導入する。その導入効率は蛍光の nucleotide で 90% 以上あることを確認している。また siRNA の抑制効果は導入後 20 時間から 72 時間まで維持できることも確認している (Sabeh F, Ota I, et al. J Cell Biol. 167:769-781, 2004)。

B) 癌幹細胞の同定

上記遺伝子導入細胞において、CD44、ALDH などの癌化細胞マーカーの同定、SP 細胞の同定、スフェロイド形成を確認することで癌幹細胞分画を同定する。

(2) 癌浸潤・転移モデルを用いた頭頸部癌移植腫瘍における *in vivo* の Wnt/Snail シグナル伝達経路による癌幹細胞の同定とその活性化の解析

我々が開発・確立した鶏卵による *in vivo* 癌浸潤・転移モデル (CAM assay) を用いて、糖尿病関連遺伝子、Wnt1 あるいは Snail を強発現させた癌細胞が、活性化癌幹細胞として生体において浸潤・転移能、さらには腫瘍増殖能を獲得するかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部癌細胞における高血糖による EMT の誘導と浸潤能の亢進 (*in vitro*)

頭頸部癌細胞における高血糖状態での Wnt、Snail、MT1-MMP の発現、それに伴う EMT の解析に引き続き、癌幹細胞マーカーの同定、スフェロイド軽装の確認などを行うことで

癌幹細胞の誘導の検討を行った。一部の癌細胞において高血糖状態、あるいはそれに伴う OGT の活性化により、Wnt-Snail のシグナル経路の活性化が認められ、EMT が誘導された。また、高血糖状態で運動能を解析したところ、コントロールの状態よりも細胞運動能が亢進していた。これらの結果より、*in vitro* において高血糖状態は Wnt-Snail シグナル経路を介して EMT を誘導し、癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。

(2) 頭頸部癌細胞における OGT 活性による浸潤能の亢進 (*in vivo*)

これまでの *in vitro* 実験に加えて鶏卵による *in vivo* 癌浸潤・転移モデルを用いた動物実験を施行した。OGT 活性化させた癌細胞では、*in vivo* においても snail の活性化を介して転移浸潤能が亢進した。(図 2)

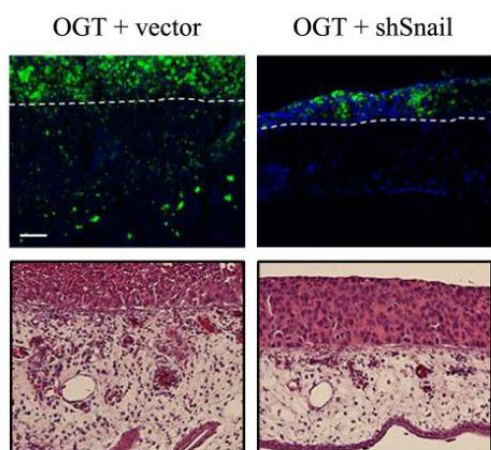


図 2 OGT 活性による Snail を介した浸潤能の亢進

以上の結果から、頭頸部癌細胞において糖尿病における高血糖状態では OGT 活性の上昇が Wnt-Snail のシグナル経路の活性化し、EMT が誘導され癌の浸潤転移能が亢進すると共に癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。したがって、EMT に関わるこれらのシグナル伝達経路を制御することは頭頸部癌の浸潤・転移を制御することに繋がると考えられ、本研究が今後の癌浸潤・転移抑制薬の創薬への試金石となり得ることが期待できる。

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 4 件)

Mikami S, Ota I, Masui T, Itaya-Hironaka A, Shobatake R, Okamoto H, Takasawa S, Kitahara T. Effect of resveratrol on cancer progression through the REG expression pathway in head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 49(4):1553-1560, 2016.

Ota I, Masui T, Kurihara M, Yook JI, Mikami S, Kimura T, Shimada K, Konishi

N, Yane K, Yamanaka T, Kitahara T. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. *Oncol Rep.* 35(1):261-266, 2016.

Lee DG, Kim HS, Lee YS, Kim S, Cha SY, Ota I, Kim NH, Cha YH, Yang DH, Lee Y, Park GJ, Yook JI, Lee YC. Helicobacter pylori CagA promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition by reducing GSK-3 activity. *Nat Commun.* 5:4423, 2014.

Masui T, Ota I, Yook JI, Mikami S, Yane K, Yamanaka T, Hosoi H. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 44: 693-699, 2014.

[学会発表](計 7 件)

Ota I, Masui T, Yook JI, Mikami S, Kimura T, Uemura H, Okamoto H and Kitahara T: The mechanism of cancer invasion and metastasis through EMT signaling in head and neck cancer. 5th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (ASHNO) March 23-25, 2017, Bali, Indonesia

Mikami S, Ota I, Masui T, Uemura H, Okamoto H, Yamanaka T, Kitahara T: Effect of resveratrol on cancer progression through REG III expression pathway in head and neck cancer cells. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer July 16-20, 2016, Seattle, USA.

Ota I, Masui T, Mikami S, Uemura H, Okamoto H, Yamanaka T, Kitahara T: Helicobacter pylori CagA promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 4th ASHNO June 3-6, 2015, Kobe, Japan.

Ota I, Masui T, Mikami S, Hosoi H: Snail-induced epithelial- mesenchymal transition generates the properties of cancer stem cells in head and neck cancer cell. AACR 2014, San Diego, USA.

Ota I, Masui T, Mikami S, Yamanaka T, Hosoi H: Snail promotes the properties of cancer stem cells through EMT pathway in head and neck cancer cells. the 5th World Congress for Head and Neck Surgery, July 26-30, 2014, NY, USA.

太田一郎、榊井貴史、三上慎司、山中敏彰、細井裕司:カゼインキナーゼ CK2 による癌浸潤・転移の制御機構 第 38 回日本頭頸部

癌学会 2014年6月12 - 13日、東京都.

榎井貴史、太田一郎、三上慎司、家根旦有、
山中敏彰、細井裕司：Snailによる癌幹細胞様特性の獲得と維持 第38回日本頭頸部癌学会 2014年6月12 - 13日、東京都.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~oto/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 一郎 (OTA, Ichiro)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00326323

(2) 研究分担者

高橋 昭久 (TAKAHASHI, Akihisa)
群馬大学・重粒子線医学推進機構・教授
研究者番号：60275336