

# 論文内容要旨

CD44 高発現口腔扁平上皮癌細胞における  
amoeboid-to-mesenchymal transition の制御機構

主指導教員：加藤 功一教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：武知 正晃准教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

副指導教員：重石 英生講師

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

横山 翔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## CD44 高発現口腔扁平上皮癌細胞における amoeboid-to-mesenchymal transition の制御機構

### 【緒言】

幹細胞は自己複製能と分化能をもつ細胞であるが、癌組織においても癌特異的な幹細胞が存在し、腫瘍の再発や転移に深く関与すると考えられている。我々はこれまで、幹細胞形質を有する CD44 高発現口腔扁平上皮癌細胞が細胞外基質や足場の弾性率の変化により、線維芽細胞様形態やアメーバ様形態に変化することを明らかとした。しかしながら、このアメーバ様形態を示す CD44 高発現口腔扁平上皮癌細胞 (amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞) の生物学的性状や, amoeboid-to-mesenchymal transition (AMT) の制御機構については未だ解明されていない。そのため、ラミニン 332 をコーティングしたシリコンゲルを用いて、amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞を培養し、検討を行った。

### 【材料・方法】

ラミニン 332 にてコーティングした 2.0 kPa のシリコンゲルを用いて、CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の 2 次元培養を行った。アクチン細胞骨格の再構築に関与する Cofilin-1 のタンパク質発現をウエスタンブロット法にて検討した。さらに、*Vimentin*, *N-cadherin*, *Snail*, *E-cadherin* の mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。また、miRNA 発現を検討するためマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 【結果】

#### ① amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞における Cofilin-1 の発現

Cofilin-1 は amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の細胞質および核内に発現を認め、TGF-β1 により Cofilin-1 タンパク質のリン酸化レベルは増加した。さらに、Cofilin-1 siRNA ノックダウンにより、amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の浸潤能は有意に減少した。

#### ② TGF-β1 による amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞への影響

TGF-β1 により amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の *N-cadherin* および *Snail* mRNA 発現は有意に増加した。さらに、TGF-β1 によって増加した *N-cadherin* および *Snail* mRNA 発現は TGF-β receptor inhibitor によって有意に減少した。また、TGF-β1 により amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞は線維芽細胞様形態に変化し、AMT が誘導された。

#### ③ TGF-β1 による ERK1/2 のリン酸化への影響

TGF-β1 により amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の ERK1/2 のリン酸化は有意に増加した。さらに、TGF-β1 により増加した *N-cadherin* および *Snail* mRNA 発現は、ERK1/2 siRNA ノックダウンにより有意に減少した。

#### ④ TGF-β1 により誘導される miRNA 発現の解析

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、TGF-β1 存在下で、miR-422a は control と比較して約 0.22 倍の発現減少を示した。

⑤miR-422a と AMT の関係について

TGF- $\beta$ 1 により抑制された miR-422a の発現は,ERK inhibitor の添加により有意に増加した. また, miR-422a のノックダウンにより, amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞における *N-cadherin* および *Snail* mRNA の発現は有意に増加した. さらに, miR-422a のノックダウンおよび Cofilin-1 siRNA ノックダウンを行ったところ, amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞の形態は線維芽細胞様形態に変化した.

⑥amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞における抗癌剤抵抗性

amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞は, mesenchymal-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞と比較して, 抗癌剤により誘導される細胞死に対して高い抵抗性を示した.

【考察】

amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞において, TGF- $\beta$ 1 は Cofilin-1 のリン酸化に関与し, さらに ERK1/2 の活性化を介して miR-422a の発現を抑制することにより, AMT を誘導することが明らかとなった. CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞は, 周囲の微小環境、すなわち細胞外基質やその硬さ, サイトカインなどの液性因子により, 表現型を線維芽細胞様形態やアメーバ様形態に変化させることが可能であり, この表現型の可塑性が, 癌幹細胞形質の重要な特徴のひとつと考えられた. また, amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞は, 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移、抗がん剤抵抗性などに関与している可能性が示唆された.