

学位論文の全文要約

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

横山 翔

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻

2020 年度

主指導教員：加藤 功一 教授

(医系科学研究科 生体材料学)

癌組織において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。

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- $\beta$ 1 存在下で、Cofilin-1 タンパク質のリン酸化レベルは増加した。また、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。TGF- $\beta$ 1 による amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞への影響を検討した結果、TGF- $\beta$ 1 存在下で *N-cadherin* および *Snail* mRNA 発現は有意に増加した。また、TGF- $\beta$ 1 によって増加した *N-cadherin* および *Snail* mRNA 発現は、TGF- $\beta$  receptor inhibitor によって有意に減少した。さらに、TGF- $\beta$ 1 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。TGF- $\beta$ 1 による ERK1/2 のリン酸化への影響を検討した結果、TGF- $\beta$ 1 存在下で 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。また、TGF- $\beta$ 1 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。さらに、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、TGF- $\beta$ 1 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。miR-422a と AMT の関係について検討したところ、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。amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞における抗癌剤抵抗性についても検討を行った結果、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、5-fluorouracil, cisplatin, docetaxel により誘導されるアポトーシスに対して高い抵抗性を示した。さらに、amoeboid-like CD44<sup>high</sup> OM-1 細胞におけるアポトーシス抵抗性には、miR-224-5p による Pannexin-1 発現の抑制が関与していることが明らかとなった。

本研究の結果から、TGF- $\beta$ 1 は Cofilin-1 のリン酸化に関与し、さらに TGF- $\beta$ 1 は 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、amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞の AMT を誘導することを明らかとした。さらに、amoeboid-like CD44<sup>high</sup> 口腔癌細胞におけるアポトーシス抵抗性には、miR-224-5p による PANX-1 発現抑制が関与することが示唆された。

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、線維芽細胞様形態やアメーバ様形態に変化す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.