

口腔扁平上皮癌細胞の酸性細胞外 pH への長期暴露による 癌幹細胞の誘導

[1] 組織

代表者：湯澤 仁

(奥羽大学歯学部)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：加藤 靖正 (奥羽大学歯学部)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

現代医学によっても癌が治療困難な疾患である大きな原因は、癌が遠隔転移を起こしてしまうことにある。遠隔転移した癌の治療は化学療法が主であるが、一度治療したと判断されても数年後に再発してしまうことが多々ある。それは癌病巣内に存在する、通常の癌細胞とは性質の異なる「癌幹細胞」の存在によるという事が多く報告され、その性質の研究に注目が集まっている。この細胞は旺盛な増殖を示さないために化学療法薬に抵抗性を示すことが再発の原因となっていると考えられている。この他の特徴として細胞接着が減少し運動性が増加する上皮間葉系移行、更に遠隔転移した臓器において腫瘍を形成する元となる造腫瘍性などの性質を有するとされる報告がある。

一方、私達は、酸性細胞外 pH が MMP-9 の発現を誘導することを発見 (*J Biol Chem* 267: 1992) して以来、これらの癌細胞の悪性形質において酸性細胞外 pH が重要な役割を演じていることを明らかにしてきた (*J Biol Chem* 280: 2005, *FEBS J*274:2007,

Cancer Cell Int.13:2013, *Cancer cell Int* 14: 2014)。これまでの研究は、酸性環境への短期暴露における影響について検討してきたが、生体における癌細胞は癌病巣内で長期に酸性細胞外 pH に暴露されていることから、本研究ではそれを考慮し、口腔扁平上皮癌細胞である NRS1 細胞を pH6.2 の条件下でおよそ 2 カ月間培養した細胞亜株 NRS1A を作出し、NRS1 細胞と比較検討した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

NRS1A は親株である NRS1 に比較し、*in vivo* での腫瘍形成能、pH7.4 条件下での Sphere 形成能や癌幹細胞マーカー遺伝子の発現等に亢進が認められた。癌幹細胞マーカーの遺伝子発現について、遺伝子発現細胞の数の増加であるのか否かを検討するために、癌幹細胞マーカー陽性細胞の分布をフローサイトメトリーにより解析した。

マウス口腔扁平上皮癌細胞である NRS1 と酸性細胞外 pH に長期曝露することで得られた NRS1A を単離し、これら二種類の細胞の細胞表面抗原の発現を検証した。癌幹細胞で特異的に発現が認められるという報告がある CD44 のバリエーションアイソフォームである CD44v、ならびに CD133、CD326、また CD44v との比較として従来型の CD44 に対する蛍光標識抗体をそれぞれ染色し、フローサイトメーターにて検出した。その結果、NRS1A 細胞では、NRS1 細胞に対して癌幹細胞マーカー陽性(CD44^{high}/CD326^{high}) の細胞群(side population, SP)の増加が認められた(Fig. 1, Table 1)。一方、CD133 については NRS1、NRS1A

ともに発現は見られなかった。

〈結論〉口腔扁平上皮癌細胞である NRS1 細胞 (CD44^{high}/CD44v^{low}/CD326^{low}) の酸性細胞外 pH への長期曝露は、SP (CD44^{low}/CD44v^{high}/CD326^{high}) を増加させることが明らかとなり、酸性細胞外環境は癌幹細胞の濃縮に重要な環境因子であることが示唆された。

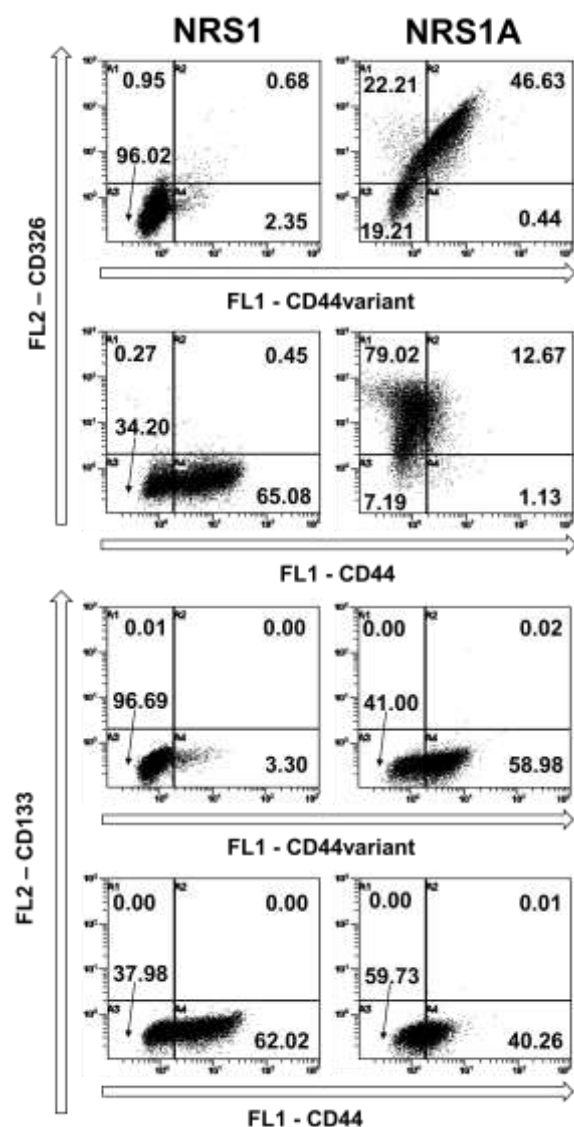


Fig 1. Flow cytometry

Table 1. Summary of flow cytometry

Marker	Positivity (%)	
	NRS1	NRS1A
CD44 ^{high}	65.53	13.8
CD44v ^{high}	3.03	47.0
CD326 ^{high}	1.63	68.84
CD44 ^{high} /CD326 ^{high}	0.68	46.63

(3-2) 波及効果・発展性

本共同研究により、微小環境因子が癌幹細胞の性質を獲得させるということが明らかとなり、癌の診断、予後予測を行う上で新たな見解を示すものである。その為には、酸性細胞外 pH に長期曝露した結果、どのようなメカニズムで癌幹細胞が濃縮されたのか詳細に検討する必要がある。従って本研究の推進は、癌の進行抑制のための新たな戦略となることが期待される。

[4] 成果資料

1. 湯澤 仁、加藤靖正：口腔扁平上皮癌細胞の酸性細胞外 pH の馴化は癌幹細胞様細胞を濃縮する。第 24 回日本がん転移学会学術集会 (大阪)、2015 年 7 月。
2. Maeda T, Yuzawa S, Suzuki A, Baba Y, Nishimura Y, and Kato Y. RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells. *Int J Oncol* 48(3):1251-7, 2016.