

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670873

研究課題名(和文) 口腔癌幹細胞の難治性に関わるエピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenetic analysis of oral cancer stem cells involved in cancer recurrence

研究代表者

來生 知 (KIOI, Mitomu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30545059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞における再発に関わる初期シグナルをエピゲノム解析するため、口腔がん患者から生検あるいは手術時に採取した未治療の癌組織を免疫不全NOGマウスに移植し、形成された2次癌を実験に用いた。一定の大きさに増殖した2次癌を予め放射線を照射した部位に移植し、増殖をみる放射線再発モデルを用いて時系列で採取し再発に関わるがん細胞からのシグナルに関してHIF-1に関わるエピゲノム解析を行った。しかしマウス遺伝子の混入が多く候補遺伝子の選定が困難であった。そのため放射線照射有無においてHIF-1活性に差が見られ、その遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイを用いて解析した。

研究成果の概要(英文)：To determine the initial signaling from the cancer stem cells for the recurrence, we implanted the cancer tissues obtained by biopsy or surgery from the patient with oral cancer into immunodeficient NOG mice (NOD.Cg-Prkdcscid 112rgtm1Sug/Jic). The grown secondary tumors were implanted into either normal or pre-irradiated site. We found activation of HIF-1 in pre-irradiated site and analyzed the gene expression profile in tumors implanted in normal or pre-irradiated site.

研究分野：歯学

キーワード：口腔癌 微小環境 難治性癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の生命予後を著しく低下させる最大の因子は局所からの再発で約3、4割に見られるとも言われ、克服すべき急務の課題である。その際、新たな腫瘍血管の形成が不可欠である。最近申請者は、放射線治療後に起こる骨髄細胞の腫瘍内への誘導を発見し、またその中で単球細胞群が腫瘍血管の再形成に重要であることを見出した(Kioi et al, J Clin Invest, 2010)。すなわち腫瘍の難治性には、血液中を還流する骨髄細胞が腫瘍内に誘導され生じる血管形成が関わることが明らかとなった。これは癌細胞、特に癌幹細胞が状況に応じて危機的状況を回避するための至適な微小環境を作り出すことによると思われる。しかしながらこの詳細はまだ解明されておらず、癌難治性における骨髄細胞の役割や分子メカニズムはまだわかっていない。癌幹細胞は血管ニッチと呼ばれる内皮細胞周囲に存在すると考えられる事から、癌幹細胞が血管内皮細胞など血管形成に影響を与えている可能性がある。近年癌幹細胞の自己複製能や腫瘍形成能、転移能などに hypoxia-inducible factors (HIFs) が関与している事や骨髄細胞の誘導に HIF が関わる事から、癌幹細胞が微小環境形成を引き起こすシグナルを見つける事が重要と思われる。

2. 研究の目的

近年癌の悪性化にクロマチン構造やヒストン修飾などによる分子発現変化、いわゆるエピゲノムが密接に関わることが示唆されている。そこで本研究では、再発に関わる口腔癌幹細胞において転写因子である

HIF-1 を介したエピゲノム変化を解析することにより、どの分子が初期のシグナルにおいて重要であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では癌の治療抵抗性を調べるため、低酸素など治療後の微小環境下における癌細胞のエピゲノム解析を行った。また局所血管が阻害された際のドラスティックな微小環境変化に対する癌細胞の応答性、特に骨髄細胞誘導につながる分子メカニズムの解明により癌幹細胞およびそれらが潜む微小環境を標的とした根治的な治療薬の可能性を探った。

4. 研究成果

(1) 癌組織を用いた実験において、癌幹細胞の特性を失わずに癌の微小環境が再現されやすい patient-derived xenograft (PDX) モデルの重要性が広く認識されるようになり、創薬の際のスクリーニングなどにも使用され始めている。しかしながら組織採取の機

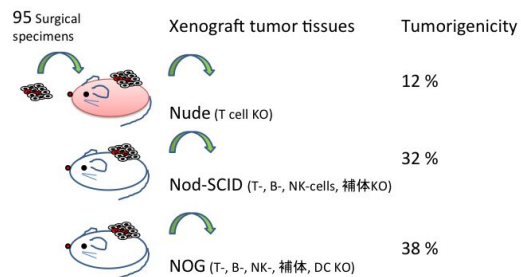


図 1

会が手術などに限られ、術前治療を標準治療とする領域の癌ではその実現性が困難で、克服すべき問題となっている。その点において口腔がんは生検にて未治療の癌組織採取が容易で、手術に比較し組織ダメージが少ない状態で組織を得られるメリットがある。当科を受診した頭頸部癌患者の中で微小環境や遺伝的影響の少ない未治療の扁平

上皮癌から生検、手術時に採取した癌組織片を免疫不全 NOG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic) マウス皮下に移植し、その造腫瘍性を解析した。これまでに申請者らは頭頸部癌患者から主に生検で得た組織をヌードマウス(T細胞欠損)、NOD-SCID (T細胞、B細胞、NK細胞欠損、補体活性欠失)、NOGマウス(T細胞、B細胞、NK細胞、補体活性欠失、樹状細胞機能不全)を用いてその造腫瘍能を検討してきた。これまでに約100例の検体を用いて行った結果、ヌードマウス12%、NOD-SCID32%、NOGマウス38%の生着率が確認された(図1)。このことよりNOGマウスを用いる事でより癌幹細胞解析に適した環境下で実験を行うことができる。患者サンプルから直接癌幹細胞を採取するには細胞数の不足が予測されるためマウスに形成させた2次癌を用いる事でフレッシュな状態でソーティングを行い、癌幹細胞を単時間で単離することが可能となった。

(2)難治癌の再発に関わる癌幹細胞のシグナルを絞り込むため、NOGマウスに形成させた2次癌からソーティングした癌幹細胞を、予め放射線を照射した部位(preIR)に移植し、その際低酸素下の癌幹細胞から引き起こされると思われる骨髓細胞誘導のメカニズム解析を行った。PreIRでは局所の血管やリンパ管は死滅しており、ほぼ100%骨髓細胞などの循環している細胞から脈管・リンパ管の再形成が引き起こされる。癌幹細胞が移植された時点において非常に低酸素で(図2)ROSやフリーラジカルの遊離が生じており癌幹細胞からの生存シグナルが短時間で活性化されるものと思われる。

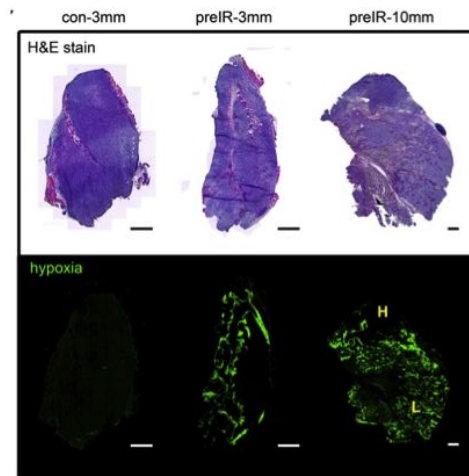


図2 Chen et al, Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2011

本方法を用いる事で、腫瘍に対する放射線の直接的な効果を排除して低酸素の微小環境変化に伴う癌幹細胞からの初期シグナルの解析が可能となる。放射線非照射部位で起こるシグナルとの比較において、移植後数時間～数週間で癌細胞を取り出し、HIF-1活性の解析を行った。播種直後のA点と長期間経過したD点では差が見られないが、C点ではpre-IRのみでHIF-1の活性化が見られた事からC点が初期シグナルを開始する点と考えられた(図3)。そこで

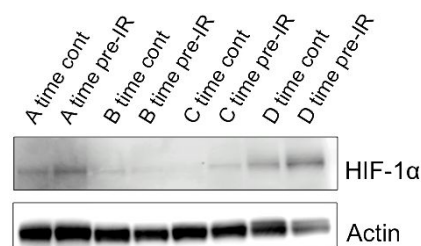


図3 腫瘍内のHIF-1活性 at pre-IR site

次にpre-IRにおける遺伝子発現変化についてマイクロアレイを用いて解析した。臨床検体と細胞株OSC-19で比較したところ、HIF-1活性化で差のあった短時間で採取したサンプル(YCUOC#011 short)でのみ遺伝子発現上昇が見られ、細胞株やHIF-1活性に差の見られない長時間で採取されたサ

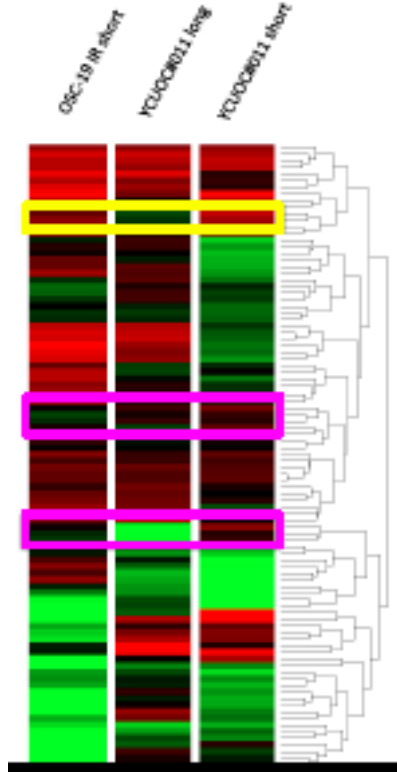


図 4 gene-clustering map in OSCC at pre-IR site

サンプル(YCUOC#011 long)で発現低下する遺伝子群(図 4, 四角で囲った部分)に着目して解析を進めている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

來生 知(KI01, Mitomu)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 30545059

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: