

令和元年6月13日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11270

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌幹細胞に対する腫瘍融解ウイルスの効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for oral squamous cell carcinoma stem cells

研究代表者

栗原 祐史 (KURIHARA, YUJI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：90514969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はテロメラーゼ作動性の腫瘍融解ウイルスにより、休眠状態にある口腔扁平上皮癌幹細胞(CSC)を効率よく殺傷することで、口腔癌の増殖、浸潤転移を制御させる臨床応用を目指した新たな治療戦略の早期開発を目指した。これまでに口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、CSCマーカーであるCD44およびCD133の発現上昇、EMT関連タンパクであるVimentinならびにE-cadherinの発現解析を行った。さらにCSC細胞集団におけるp21、p53ならびにE2F-1のタンパク発現動態の解析を進めてきた。また、CD44のmiRNAの発現量の解析を進め、薬剤耐性に関与している3つのmiRNAの関連性を見い出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗癌剤や分子標的治療では正常細胞への影響を無視できず、癌細胞特異的な標的療法が望まれている。生体において一部の精巢細胞を除きテロメラーゼは癌細胞にしか存在せず、このテロメラーゼ構成分子をプロモーターとして増殖するウイルス製剤は非常に高い癌細胞特異性を持つ。本研究では、口腔癌に対するウイルス製剤をさらに効果的に作用させるため、口腔癌幹細胞をターゲットとするためのメカニズム解析を行った。その結果、休眠状態にある口腔癌幹細胞の活性化させる遺伝子を見いだすことができ、今後、当該ウイルスをより効果的に作用させることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at early development of new treatment strategy of clinical application to control the growth, invasion and metastasis of dormant stem cell of oral squamous cell carcinoma by Telomerase-Specific Replication-Selective virus. At first, expression analysis of CSC markers CD44 and CD133, EMT-related proteins Vimentin and E-cadherin was performed using an oral squamous cell carcinoma cell line. Furthermore, we analyzed protein expression dynamics of p21, p53 and E2F-1 in CSC cell populations. We also analyzed the expression levels of CD44 miRNAs by micro array and found the relevance of the three miRNAs involved in drug resistance.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 ウイルス治療 stem cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは、癌細胞特異的に発現していることが知られており、癌治療の標的として最も注目されている分子の一つである。申請者の共同研究グループである岡山大学が開発したウイルス製剤テロメライシン (Telomelysin, 開発コード: OBP-301) は、テロメラーゼ構成分子である hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子をプロモーターとし、E1 遺伝子を駆動することでウイルスの増殖を誘導する。このためテロメラーゼを発現していない正常細胞ではウイルスが増殖せず、癌細胞に特異的に働く腫瘍融解ウイルスである。申請者は口腔扁平上皮癌および腺様嚢胞癌におけるテロメライシンの有効性を確認し、また、このテロメライシンに GFP 遺伝子を組み込み、可視化したテロメスキャン (TelomeScan, OBP-401) をヌードマウスの舌癌移植モデルに用いたところ、頸部リンパ節転移の検索が可能であることを報告している。一方、癌の根源を成す癌幹細胞 (CSC) は、「自己複製能」とともに、様々な細胞に分化することができる多分化能を有している。つまり、癌幹細胞を根絶しなければ、癌の根治は難しいと考えられる。さらに、この癌幹細胞は分裂停止状態に留まることができ、多くの場合、細胞周期が静止した「休眠状態」にある。そのため、増殖期にある細胞に有効な抗癌剤や放射線に抵抗性を示し、ごく少数の癌幹細胞が生き残っていれば癌の再発の原因となる。ウイルスは本来、自らの DNA を複製するために感染した細胞の細胞周期を回転させる機能がある。そこで申請者は、「口腔扁平上皮癌細胞は抗癌剤や放射線に抵抗性を獲得するため、EMT を伴う CSC に形質変化し、休眠癌幹細胞となるが、テロメライシンはその休眠状態に対して細胞周期を回転させることで細胞を活性化させ、抗腫瘍効果を発揮する。」との仮説を立て、これらのメカニズムの解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究はテロメラーゼ作動性の腫瘍融解ウイルス (テロメライシン & テロメスキャン) による口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果のみならず、休眠状態にある癌幹細胞の細胞周期を回転させることにより、効率よく癌幹細胞 (CSC) を殺傷することで口腔癌の増殖、浸潤転移を制御させる臨床応用する新たな治療戦略の早期開発を目指した。特に本研究期間では、口腔扁平上皮癌幹細胞の薬剤耐性に関与する miRNA を同定することを中心としたメカニズム解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、抗癌剤に耐性を獲得した口腔扁平上皮癌細胞の CSC への形質変化のメカニズムを解析した。さらに同定された CSC 細胞集団の細胞周期調節因子についての発現動態を解析した。次にテロメラーゼ作動性腫瘍融解ウイルス製剤 (テロメライシン & テロメスキャン) の CSC 細胞集団への作用機序について検討し、生体において低用量ウイルス力価で最大限の抗腫瘍活性を発揮するための基礎的な根拠を確立する予定としたが、CSC 細胞のさらなる解析を行った。

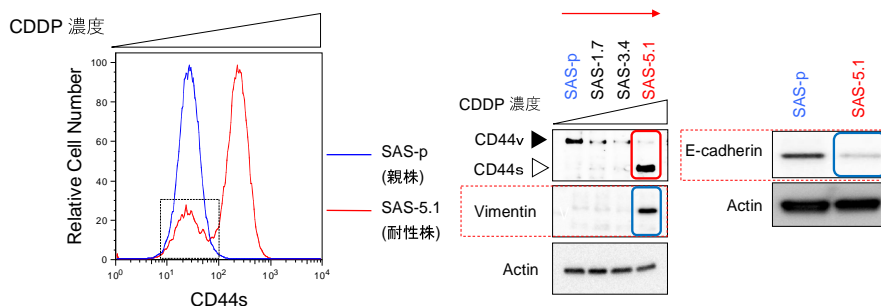
まず、抗癌剤抵抗性を示す細胞集団の同定を試みるため、舌扁平上皮癌より樹立された細胞株をシスプラチン (CDDP) に暴露し、48hr 後に、既知の CSC マーカーである CD44、CD133 の発現と ALDH の活性をフローサイトメトリーにて評価した。次に発現変化を認めた細胞集団を FACS Aria にてソーティングし、ウェスタンブロッティングにて Vimentin ならびに E-cadherin のタンパク発現の解析を行うとともに、EMT-regulator を探索するため mRNA の網羅的発現解析を行った。これによって発現変化の見られた miRNA から薬剤耐性に関与している miRNA の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) CDDP 耐性株における CD44 および EMT マーカーの発現解析

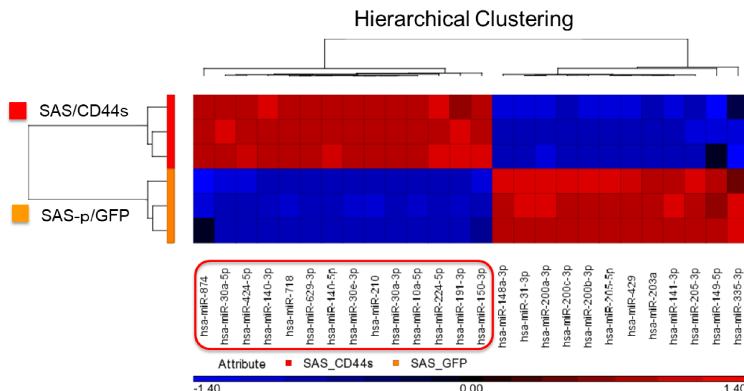
口腔扁平上皮癌細胞株 SAS および同細胞株より樹立したシスプラチン 5.1 μM に耐性を持った細胞株を用いて、CD44s の発現変動を解析した。その結果、5.1 細胞株では CD44s の発現が亢進していることを確認した。また、CD44v と CD44s で、どちらのアイソフォームが発現しているか検討した結果、シスプラチンの耐性化に伴い、CD44v の発現減少が起こり、CD44s が発現亢進していた。更に耐性化に伴い、上皮マーカーである E-cadherin の発現が減少と間葉のマーカーである Vimentin の発現の亢進が認められ、EMT の誘導が観察された。

CD44 s の発現変動



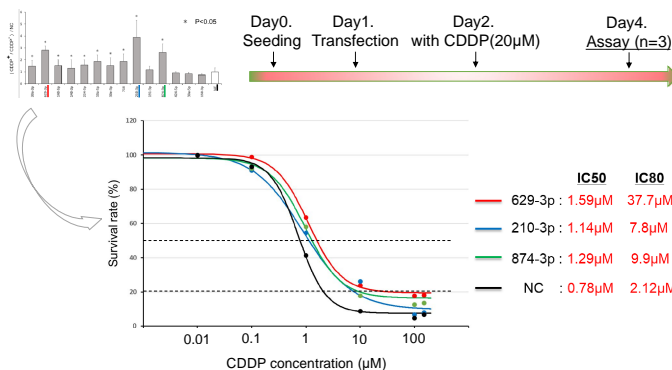
(2) SAS-p/GFP 細胞と SAS-p/CD44s 細胞における miRNA の発現量の解析

親株である口腔扁平上皮癌細胞 SAS に GFP を強制発現させた SAS-p/GFP 細胞と、CD44s を強制発現させた SAS-p/CD44s 細胞を用いて、マイクロ RNA に対するアレイによる解析を行いました。その結果、CD44s 細胞はコントロール群である GFP 細胞と比べて、明らかに異なった成分を示していた。ヒートマップ上 14 個の miRNA において、CD44s 細胞と GFP 細胞での発現量が変化していることを見出した。



(3) 口腔扁平上皮癌細胞における CDDP 耐性能の獲得因子の解析

上記の miRNA より口腔扁平上皮癌細胞における CDDP 耐性能を獲得しうる因子について検討した結果、3 種類の miRNA において SAS にトランスフェクションを行ったところ、miR-629 が特に CDDP 耐性能を獲得している可能性が示唆された。



(4) 考察

以上より、口腔扁平上皮癌細胞における CDDP 耐性能の獲得因子として 3 つの因子の関与が示唆された。特に miR-629 の発現増強が強く関与していると考えられた。そこで、今後はこれらの因子のターゲット遺伝子の解明を行い、細胞周期に影響している遺伝子を見出し、発現抑制を行うことで、休眠状態となる口腔扁平上皮癌幹細胞の薬剤耐性を抑制することで、当該ウイルスの効果を増強させるメカニズム解析を行う必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔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)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：椋代義樹

ローマ字氏名：MUKUDAI YOSHIKI

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部口腔外科学講座

職名：助教

研究者番号（8桁）：50325099

研究分担者氏名：近藤誠二

ローマ字氏名：KONDO SEIJI

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部口腔外科学講座

職名：兼任講師

研究者番号（8桁）：10432634

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。