

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20238

研究課題名(和文) CD271を発現する頭頸部癌幹細胞の生存戦略解明と治療戦略への展開

研究課題名(英文) Survival mechanism of CD271-positive HNSCC and its therapeutic intervention

研究代表者

今井 隆之 (IMAI, TAKAYUKI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：80408583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD271は下咽頭癌幹細胞マーカーであるが、CD271の機能とがん組織の維持における役割については明らかになっていない。そこでCD271陽性頭頸部癌幹細胞の生存戦略を解明することを目的として解析をおこなった。腫瘍形成には、CD271が必要であった。細胞周期はG0にアレストした。シグナル伝達系を調べたところ、MAPK(Erk)シグナルが減少していた。エフェクター分子であるRhoAに対する阻害を行ったところ、細胞遊走が著明に抑制された。Erk阻害薬を添加したところ、細胞増殖を著明に抑制した。以上の結果から、CD271のシグナル伝達系を標的とした治療が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine a potential role of CD271 in a squamous cell carcinoma, CD271 was knock-downed by shRNA. CD271 mRNA knockdown inhibited both cell proliferation and migration. p42/44Erk inhibition as well as RhoA inhibition ameliorated the malignant phenotypes of hypopharyngeal HPCM2 cells. An anti-CD271 Ab, however, did not show a significant in vitro effect on the cells. Taken together, CD271 is shown to be a potential target for squamous cell carcinoma therapy.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：CD271 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、発声、嚥下等の生体機能を損なうことから、単に生命予後のみならず Quality of Life の観点からもその克服が急がれている。頭頸部癌の大部分を占める扁平上皮癌は、強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘍を形成しながら頭部・頸部さらに体幹へとリンパ管・静脈に沿って浸潤・転移する。手術不能症例および再発症例では CDDP 等の抗癌剤および放射線治療が選択されるが、生命予後は不良である。効果的な治療法開発のためには適切な標的が必要となるが、明確なドライバー変異がないため治療標的が絞れず、新たな観点からのアプローチが必要となっていた。

(2) 頭頸部がん患者由来組織を用いてセルソーターによる癌亜集団の解析を開始した。CD44, CD90 等の癌幹細胞マーカーに着目して細胞を分取し、超免疫不全マウス (NOG マウス) に移植した (腫瘍形成能スクリーニング)。その結果、CD271 が下咽頭癌のがん幹細胞マーカーであることを世界に先駆けて見出した。がん幹細胞理論では、がん幹細胞は悪性形質の本態と捉えられている。すなわち、①非対称分裂による多様性獲得、②浸潤・転移能の獲得、③薬剤耐性と治療抵抗性の獲得、という3つの性質の根源はすべて癌幹細胞に帰着すると言い換えることができる。

(3) これまでの解析によって、頭頸部癌幹細胞における興味深い2つの特徴を発見した。一般に幹細胞は非幹細胞に比べて細胞周期が長い傾向があるとされるが、頭頸部癌においては、癌幹細胞は非癌幹細胞に比べて増殖能がむしろ亢進している例が多く Dormancy が欠如していることも示唆されていた。

(4) CD271 を強く発現する頭頸部癌は有意に予後が悪いが、頭頸部癌における CD271 の細胞生物学的機能など、解析が不十分であった。

2. 研究の目的

(1) CD271 と頭頸部癌幹細胞との関連を明らかにするため、以下の3点を具体的目標とする。

(2) 頭頸部癌細胞株を使って、CD271 が幹細胞性の発揮するためのシグナル伝達を同定し、機能ドメイン阻害による治療効果について明らかにする。

(3) CD271 に対する特異的モノクローナル抗

体を樹立し、in vitro における腫瘍縮小効果について明らかにする。

(4) CD271 が誘導する遺伝子群について解析し、悪性形質発現や生体防御からの逃避に着目してその意義を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 頭頸部がん由来細胞株を用いた CD271 シグナルの解析

頭頸部がん由来細胞株 HPCM2 株を用いて造腫瘍形成に必要な CD271 の機能ドメインの同定と治療効果の検定を行う。腫瘍形成に重要な CD271 の細胞内ドメインを同定するため、CD271 変異体 (細胞質内欠損 dC 変異体) を用いて腫瘍形成等を調べる。

(2) 抗 CD271 特異抗体を用いた in vitro 治療モデルの解析

抗 CD271 抗体の樹立を行う。マウスに対し CD271 ペプチドを免疫し、ハイブリドーマを調整する。スクリーニングを実施し特異抗体の樹立を行う。抗体が得られた場合は、腫瘍増殖阻害などの効果をみる。一方で、市販抗体を用いて増殖阻害活性を調べる。

(3) CD271 シグナル阻害による治療モデルの解析

CD271 シグナルのうち siRNA を用いて CD271 をノックダウンし、MAPK (ERK), JNK および p38 等のシグナルに対する影響を調べる。さらに、RhoA に関する関連性を明らかにするため Rho-GDI 阻害ペプチドである TAT-Pep5 を用いて同経路の阻害を行い、細胞増殖を観察する。細胞周期を FACS にて解析する。さらに、スクラッチアッセイやトランスウエルアッセイなどを用いて細胞増殖への影響を明らかにする。ERK に着目し、その阻害を行うことで、上記への効果を観察する。標的遺伝子を同定するため、mRNA 発現比較をマイクロアレイによって実施し解析する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍形成に関わる細胞内ドメインの同定。細胞内ドメインを全部欠損した dC 変異体を HPCM2 に導入した。細胞増殖の低下傾向を認めたが有意ではなく、この原因として既存の CD271 が十分に発現していることが想定された。

(2) CD271 ノックダウンは腫瘍増殖を著明に低下させる

shRNA 発現ベクターを導入することによって HPCM2 株の CD271 を安定的にノックダウンすることに成功した。この細胞は著明に細胞増殖が抑制されており、シグナル伝達系を解析

したところ、MAPK(ERKp42/44)が減少していた。ERK 阻害薬 U0126 を添加したところ、細胞増殖は著明に抑制された。したがって ERK 経路は CD271 抑制による増殖阻害に関連する可能性が高いことが判明した。

(3)CD271 シグナルを阻害すると細胞遊走が低下する

HPCM2 株を用いて CD271 ノックダウンを行った。細胞遊走は CD271 ノックダウンにより著明に抑制した。さらに、RhoA に対する阻害を行ったところ細胞遊走が抑制された。したがって、RhoA 阻害は CD271 による細胞遊走に関与する可能性が高いと考えられた。

(4)CD271 は細胞周期を停止させ G0 アレストを誘導する

CD271 ノックダウンにより細胞周期が G0 にアレストした。さらに、G0 アレストに重要な CDKN1C が発現上昇していた。CDKN1 のノックダウンを更に行ったところ、G0 アレストが部分的に解除された。したがって、CD271 の下流シグナルは複数存在し、細胞増殖と細胞遊走を別個に制御していることが示唆された。この事実は CD271 が癌治療の標的であることを強く示唆していると考えられた。

(5)CD271 抗体による扁平上皮癌の細胞増殖は不十分である

CD271 特異抗体の作成についてマウスにリコンビナント蛋白の免疫を行い、ハイブリドーマ作成を行ったが、有益な抗体は得られなかった。市販抗体を用いた in vitro 細胞増殖抑制試験を行った。細胞増殖は有意な阻害を受けておらず、今後新たなエピトープ特異性を有する抗体開発が必要と思われた。

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 5 件)

①Asada Y, Kurosawa K, Matsumoto K, T, Goto T, Katoh K, Imai T, Saijo S, Matsuura K. Laryngeal function-preserving operation for T4a laryngeal cancer with vocal code paralysis - A case report. *Auris Nasus Larynx* in press DOI: 10.1016/j.anl.2017.03.012

②Imai T, Satoh I, Matsumoto K, Asada Y, Yamazaki T, Morita S, Saijo S, Okubo JI, Wakamori S, Saijo S, Matsuura K. Retrospective observational study of occult cervical lymph-node metastasis in T1N0 tongue cancer.

Jpn J Clin Oncol. 2017 Feb 26;47(2):130-136. doi: 10.1093/jjco/hyw172.

③ Imai T, Goto T, Matsumoto K, Kurosawa K, Asada Y, Saijo S, Matsuura K. Late-onset dysphagia caused by severe spastic peristalsis of a free jejunal graft in a case of hypopharyngeal cancer. *Auris Nasus Larynx.* 2016 Dec;43(6):693-7. doi: 10.1016/j.anl.2016.03.011.

④ Imai T, Satoh I, Matsumoto K, Ito S, Asada Y, Kato K, Koshiba Y, Saijo S, Matsuura K. Clear cell carcinoma of the nasal cavity: A case report from histopathological viewpoint. *Auris Nasus Larynx.* 2016 Feb;43(1):108-11. doi: 10.1016/j.anl.2015.06.002.

⑤ Mochizuki M, Tamai K, Imai T, Sugawara S, Ogama N, Nakamura M, Matsuura K, Yamaguchi K, Satoh K, Sato I, Motohashi H, Sugamura, K. & Tanaka, N. "CD271 regulates the proliferation and motility of hypopharyngeal cancer cells" *Scientific Reports* 6, Article number: 30707. (2016) doi: 10.1038/srep30707

[学会発表] (計 5 件)

①Tanaka N, Imai T, Mochizuki M, Sugawara, S, Tamai K, Yamaguchi K, Satoh K, and Sugamura K.

CD271 defines a cancer initiating cell population in hypopharyngeal cancer AACR2015, 2015 年 4 月 18 日-22 日 ペンシルバニア州フィデルフィア(アメリカ合衆国)

②望月麻衣、今井隆之、玉井恵一、本橋ほづみ、田中伸幸. CD271 marks cancer initiating cells in hypopharyngeal carcinoma with enhanced proliferation potential. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 名古屋市

③今井隆之. A case report of late-onset dysphagia caused by the severe spastic peristalsis of a free jejunal graft. 16th Japan-Korea joint meeting of otorhinolaryngology-head and neck surgery. 2016 年 3 月 東京

④今井隆之. 下咽頭癌における癌幹細胞表面マーカーCD271 の機能解析(遊走、浸潤)第

39 回日本頭頸部癌学会、第 4 回アジア頭頸部
癌学会 2015 年 6 月 神戸市

⑤今井隆之, 鼻腔原発 Clear Cell Carcinoma
の 1 症例. 第 25 回日本頭頸部外科学会学術
講演会. 2015 年 1 月 大阪市

〔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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 隆之 (IMAI, Takayuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立
がんセンター (研究所) ・がん先進治療開発
研究部 ・特任研究員

研究者番号 : 80408583

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

松浦 一登 (MATSUURA, Kazuto)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立
がんセンター (研究所) ・がん先進治療開発
研究部 ・特任研究員

研究者番号 : 70271947

(4) 研究協力者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立
がんセンター (研究所) ・がん先進治療開発
研究部 ・部長

研究者番号 : 60280872