

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20288

研究課題名(和文) 新規頭頸部がん幹細胞マーカーCSPG4の解析と治療戦略への応用

研究課題名(英文) CSPG4 is a putative cancer stem cell marker and potential therapeutic target of HNSCC

研究代表者

泉山 慶子 (Izumiyama, Keiko)

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・共同研究員

研究者番号：60774031

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)：頭頸部がんのがん幹細胞マーカー候補としてCSPGに着目し、幹細胞性々と治療応用の展開を探った。CSPGをがん細胞株に発現させたが、通常の培養条件では幹細胞性に著明な変化を示さなかった。一方、ウエスタンブロットでは複数のバンドが検出され、糖鎖修飾され細胞外に発現していること、細胞内では断片化して分解されることが判明した。がん幹細胞以外にも発現しているため、今後CAR-T細胞の新たな標的となることが期待され、新たな標的として応用が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CSPG4 is a potential marker of head and neck cancer stem cells, and its potential in future cancer therapy was investigated. Introduction of CSPG4-expression vector into cancer cells resulted in appearance of multiple bands representing heavily glycosylated forms as well as degradation products. Expression of CSPG was not strictly restricted in cancer stem cells, and malignant cancer cells expressed CSPG4. Therefore, CSPG4 is a potential therapeutic target of head and neck cancer including a CAR-T cell therapy.

研究分野：頭頸部腫瘍学

キーワード：頭頸部癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は、世界的に発症が多い悪性腫瘍であり、有効な外科的切除が不可能な症例では致命率が高い。自覚症状に乏しいことも多く、進行がんとして発見される症例も多い。転移や再発が多く、放射線療法、化学療法を施行しても予後不良例が多い。頭頸部がんは明確なドライバー変異がないため、治療戦略上検討しなければいけない点が多い。外科的切除以外には有効な分子標的薬や細胞障害性薬剤がほとんど存在しないため、新規治療薬の開発が急務となっている。

(2) 近年の研究において「がん幹細胞」が注目されている。腫瘍は単一の細胞集団ではなく、幹細胞性を有する細胞（CSC）が造腫瘍能を持つ。大多数の非がん幹細胞(non-CSC)は、抗がん剤および放射線に感受性を有する。CSCは、①自己複製能、②多分化能、③抗がん剤・放射線抵抗性、を3大主徴とし、治療抵抗性の元凶であるとされる。実際に、乳がんや脳腫瘍などでCSCの存在が相次いだ。と頭頸部がんにおいてもがん幹細胞理論はあてはまると考えられる。CSCをターゲットとした治療は、次世代の先進的治療法として期待を集めている。

(3) HNSCCにおいてCSCを特異的に区別する方法があれば、新たな選別的治療が開発できる可能性がある。実際に、乳がん等では、CD44⁺/CD24⁻がCSCマーカーであることが報告され、CD44を治療標的とする実用化が進んでいる。申請者の研究室では、頭頸部扁平上皮がん臨床検体を用いてFACS AriaII

を利用して、細胞表面抗原別に細胞を分取し超免疫不全マウス（NOG）に移植した（腫瘍形成能スクリーニング）。その結果、CD271が頭頸部がん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。しかしながら、CD271は正常神経系にも発現していることから、治療標的としては不適切であると想定され、治療開発に進むことができずにいた。

(4) 第2のがん幹細胞マーカーを求め、申請者はCD271陽性細胞に特異的に発現する分子のスクリーニングを行った。その結果CSPG4が、がん幹細胞に発現することを突き止めた。CSPG4は悪性黒色腫に発現するコンドロイチン硫酸糖鎖抗原(Chondroitin Sulfate Proteoglycan)であり、機能は未解明である。1回膜貫通ドメインを持ち、細胞表面に発現することから、細胞接着やシグナル伝達能を有することが示唆されている。先行研究では、悪性黒色腫のがん幹細胞マーカーとしての報告があるものの、頭頸部がんにおいて、CSPG4と「がん幹細胞」に関する解析はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

(1) CSPG4は単なる幹細胞マーカーではなく、がん幹細胞性と悪性化能を付与する、という仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証するために以下の4点を明らかにする。
①HNSCCのがん幹細胞性発揮に必要なCSPG4の機能は何か？
②HNSCCのがん幹細胞性を発揮する会合分子は何か？
③HNSCCのがん幹細胞性を伝達するパスウェイは何か？
④CSPG4を標的とした頭頸部がん治療モデルは構築できるか？

以上の解析により、本研究では CSPG4 を切り口とした頭頸部がん幹細胞のバイオリジンを展開し、特異的治療法開発の基盤構築に挑むことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CSPG4 の阻害によって、がん幹細胞の性質を阻害できるかを検討する。CSPG4 の阻害方法としては、レンチウイルスベクターを用いた shRNA および CRISPR/Cas9 を用いる。がん幹細胞性の評価は、以下の通り計画する。
①スフェア形成能評価：スフェア用培地 (Ham F12/EGF/FGF/B17 supplement) での培養、②抗がん剤耐性：シスプラチン・パクリタキセル等の添加によるアッセイ、③幹細胞性マーカーの発現：realtime-PCR を用いた Nanog 等多分化マーカーの比較、④浸潤能評価：マトリゲルチャンバーを用いた invasion assay による比較、⑤in vivo 評価：免疫不全マウス移植系 (NOG) に対して腫瘍縮小効果があるか？について調べる。

(2) CSPG4 が活性化するパスウェイおよび標的分子を調べる。腫瘍形成には、CSPG4 の下流シグナルが重要であると考えられる。そこで、細胞質内領域を欠損する CSPG4 変異体を用いて腫瘍形成に必要な部位を決定する。RhoA, CDC42 などのシグナルに着目して、CSPG4 下流に関するパスウェイを同定する。CSPG4 ノックアウト細胞、CSPG4 変異体発現細胞を野生型 CSPG4 発現細胞からそれぞれ RNA を抽出し解析を行う。一方、細胞の浸潤に関係する RhoA, CDC42 等については、直接の会合があるかどうかウエスタンブロッティングを用いて検討する。さらに、頭頸部癌

の悪性化と密接なアクチン重合について調べる。CSPG4 発現細胞株について共焦点顕微鏡観察を行い、細胞形態の変化やアクチンの染色性を解析する。

4. 研究成果

(1) CSPG4 過剰発現が、がん細胞に与える影響
CSPG4 発現ベクターを構築し、293T を含むがん細胞株に遺伝子導入した。導入細胞では明確な細胞増殖の亢進は認められなかった。発現細胞をウエスタンブロット解析したところ、ブロードな複数のバンドが検出された。この理由として、糖鎖修飾による分子量の連続的な分布がおこるものと考えられた。一方、複数のバンドの存在から、細胞内における断片化と分解が比較的早期に起こっている可能性があると考えられる。

(2) CSPG4 発現による幹細胞性の明らかな変化は認められなかった。幹細胞性マーカーについても明確な差異を見出すことができなかった。浸潤能についても観察した限りにおいて、明確な亢進を示さなかった。

(3) CSPG4 が活性化するシグナルパスウェイについては、明確な差異が認められなかった。RhoA および CDC42 との関連については、今後さらに検討が必要であると考えられる。

(4) CSPG4 発現による細胞骨格系の影響については、明らかな変化は認めなかった。形態変化をふくめさらに検討が必要であると考えられる。

(5) CSPG4 は悪性形質を示すがんに発現して

いた。したがって、今後 CAR-T 細胞の標的化を含め、新たな治療標的としての可能性が高いと考えられる。

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 1 件)

①西川路武人, 小鎌直子, 泉山慶子, 長島隆一, 田中伸幸
扁平上皮癌の増殖と浸潤を同時に制御する鍵分子 S100A10 の同定と機能解明.
第 7 1 回日本細菌学会東北支部総会 2017 年 8 月 3-4 日 宮城県仙台市

[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

泉山 慶子 (IZUMIYAMA, Keiko)

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・共同研究員

研究者番号: 60774031

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(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