

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11396

研究課題名(和文) 唾液腺がんにおける幹細胞の高悪性化と薬剤耐性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Characters of stem cells from salivary carcinoma cells

研究代表者

伊地知 圭(Ijichi, Kei)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：50510278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：A-253細胞株、NCU-SCD1細胞株とも、CD44陽性細胞を有する割合は極めて低かった。そのため、CD44陽性細胞が十分な量が得られず、CD44陰性細胞との比較は困難であった。そこで、頭頸部扁平上皮癌を含む様々な細胞株、初代培養株を用いて、CD44陽性細胞の割合を検討した。CD44陽性細胞を多く含む細胞株は、マウスに対する腫瘍造性能も良好であり、両者に関係があることが示唆された。マウス皮下腫瘍を作成したところ、CD44陽性細胞を一部含み、接種した細胞が分化して腫瘍を形成していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は唾液腺がん幹細胞の低酸素環境における動態を解明し腫瘍微小環境におけるがん幹細胞を標的とした治療法、治療薬開発などの臨床応用を展開することを目的とした研究である。低酸素で癌が悪性化する機序として低酸素が候補として考えられているが、低酸素で活性化される経路を解明することにより、適切な治療ターゲットの選別に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Both A-253 and NCU-SCD1 cell lines had a very low percentage of CD44 positive cells. Therefore, it was difficult to obtain sufficient amount of CD44 positive cells and to compare them with CD44 negative cells. Therefore, we examined the percentage of CD44-positive cells in various cell lines, including squamous cell carcinoma of the head and neck and primary culture lines. When subcutaneous tumors were generated in mice, some of the cells contained CD44-positive cells, suggesting that the inoculated cells were differentiating to form tumors.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：唾液腺癌 低酸素

1. 研究開始当初の背景

がん組織の低酸素領域では周辺組織への浸潤と転移、そして放射線や薬剤への耐性などの悪化因子が増加する。唾液腺がんでは浸潤や転移によって患者の予後を悪化させるばかりでなく、手術範囲が拡大することによって顔面麻痺、咀嚼嚥下機能障害など多くの機能障害を引き起こす。したがって、唾液腺がん組織の低酸素領域での高悪性化を促進させるメカニズムを解明することは至急の課題である。

がんの低酸素領域では低酸素誘導転写因子 (hypoxia inducible factor 1 : HIF-1) が多くの癌細胞内で活性化される。低酸素環境下では HIF-1 が安定化し、様々な転写因子を活性化することで、血管新生、放射線や薬剤への耐性、浸潤・転移能の増加など癌の悪性化に関与している (Semenza GL et al, Cancer Cell, 2004)。したがって低酸素領域で HIF-1 およびその調節因子を標的とした薬剤の開発が世界中で進められている。一方で転写因子である STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) は多くの癌で恒常的に活性化されており、また STAT3 活性化の抑制が癌細胞株の増殖を抑制することからも癌治療の分子標的の 1 つとして注目されている。STAT3 は IL-6 ファミリーのサイトカイン、G-CSF、EGF などの増殖因子などによる Janus キナーゼ (JAK) の活性化とそれに引き続く、JAK と STAT3 のリン酸化カスケードにより活性化される (JAK-STAT 経路) (Lai SY, et al. Drug Resist Updat., 2010)。また最近では、低酸素刺激によっても STAT3 が活性化され、HIF-1 の発現を誘導したり、結合して特異的な遺伝子発現を誘発することで癌をより悪性化に導くことが分かりつつある (Niu G. Mol Cancer Res, 2008)。

我々はこれまで、分子標的薬に対する耐性機構の有力な候補として EMT ならびにがん幹細胞 (CSC) に着目し、CSC 形質も有する頭頸部がん細胞モデル (UMSCC-81B 株) を確立した。これらを用いて EGFR 標的薬である Gefitinib (EGFR チミジンキナーゼ阻害薬) の抗腫瘍効果とその機構についてこれまでに検討してきた。その結果、EMT/CSC 形質を示す UMSCC81B 株は EMT / CSC 形質を示さない他の頭頸部癌細胞株に比べて Gefitinib 抵抗性であることを明らかにした (Maseki S. et al Br J Cancer 2012)。

また、共同研究者の足立はこれまで低酸素環境下にある頭頸部癌に対する治療戦略の 1 つとして STAT3 に着目し、STAT3 阻害剤である Stattic を用いて低酸素環境下にある頭頸部癌細胞に対する殺細胞効果や作用機序の解析を行ってきた。その結果、Stattic により STAT3 のリン酸化を阻害することで、HIF-1 の発現を阻害し、in vitro および in vivo の両方で頭頸部癌の放射線増感作用がみられ、STAT3 をターゲットとした分子標的治療の可能性を示した (Adachi M. et al Oral Oncol 2012)。

がん細胞は酸素の有無に関係なく解糖系の利用が亢進しており、癌幹細胞のマーカーである CD44 が解糖系の亢進を維持していることが示された (Tamada M et al. Cancer Reserch 2012)。CD44 のバリエーションフォーム CD44v 陽性頭頸部がん細胞株は EGFR 治療に抵抗性であり、またがん細胞の増殖浸潤および転移への関連性があることが知られている。がんの低酸素領域では HIF-1 が誘導され、STAT3 は EGFR とシグナル伝達があることから、幹細胞マーカーである CD44 による解糖系亢進ならびに EGFR 治療抵抗性と深く関与していると推測し、本研究では唾液腺がん細胞を用いて低酸素環境下での幹細胞化と HIF-1 および STAT3 の役割、とくにシグナル伝達系を明らかにするとともに、幹細胞化に伴う CD44 によるエネルギー代謝の変化と転移浸潤を促進させる細胞内微小環境のメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、これらにより高悪性唾液腺癌に対する治療薬の新たな分子標的候補の同定を目指す。

2. 研究の目的

本研究は唾液腺がん幹細胞の低酸素環境における動態を解明し腫瘍微小環境におけるがん幹細胞を標的とした治療法、治療薬開発などの臨床応用を展開することを目的とする。

1. 低酸素環境下におけるがん幹細胞の幹細胞マーカー CD44 と STAT3 の分化多能性 (ステムネス) 維持や細胞増殖の調節機構を明らかにする。
2. 低酸素環境下におけるがん幹細胞のエネルギー代謝を明らかにし、エネルギー代謝と低酸素誘導因子 (HIF-1) との関連性を解明する。
3. STAT3 のノックダウン唾液腺がん幹細胞を作成し STAT3 が低酸素環境下においてどのようにがん幹細胞のエネルギー代謝機構の調節に関与しているのかを明らかにする。
4. 癌細胞のエネルギー代謝は正常細胞と異なり、アポトーシス (細胞死) が誘導されるのを避けるため、あえて効率の悪い解糖系が亢進している (Warburg 効果)。がん幹細胞においても同様に解糖系が亢進していると考えられているが明らかになっていない。そこで、低酸素環境におけるがん幹細胞のエネルギー代謝を制御しアポトーシスを誘導できるか検討する。
5. 低酸素環境におけるがん幹細胞のエネルギー代謝を制御し効率的にがん幹細胞をアポトーシス誘導する治療法、治療薬を模索する。

3. 研究の方法

1. *in vitro* 低酸素環境下における唾液腺がん幹細胞のエネルギー代謝の解明

癌細胞は急激な細胞増殖を維持するためにエネルギー代謝を解糖系優位にスイッチすることが知られている。その一方で、がん幹細胞の低酸素環境下におけるエネルギー代謝機構は解明されていない。そこで 1%O₂ 低酸素培養条件下におけるがん幹細胞のエネルギー代謝を明らかにする。当研究室で所有している 2 種の唾液腺癌細胞株 A-253, NCU-SCD1 よりがん幹細胞マーカーである CD44 陽性細胞を MACS 磁気分離法により分取し、1%O₂ 低酸素培養条件下における NAD/NADH 比、NADP/NADPH 比、GSH/GSSG 比を蛍光定量を行うことで、ペントースリン酸経路やグルタチオン代謝、脂質代謝の変化を、またミトコンドリアの呼吸は蛍光プローブを用い、フローサイトメトリーアナライザーにて検出し、ROS 産生をモニタリングすることで親細胞株もしくは CD44 陰性細胞と比較検証する。

2. *in vitro* 低酸素環境下におけるがん幹細胞のエネルギー代謝と低酸素誘導因子 (HIF-1) 関連シグナル伝達との相互関係を明らかにする

低酸素誘導因子 (HIF-1) は癌細胞のエネルギー代謝を制御していると言われている。しかしながら HIF-1 関連シグナル伝達とエネルギー代謝との相互関係は未だ明らかになっていない。そこで、HIF-1 関連シグナル伝達を抑制した場合のエネルギー代謝変化を NAD/NADH 比、NADP/NADPH 比、GSH/GSSG 比、ROS 産生を検出し、それを幹細胞マーカー CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞もしくは親細胞株とで比較検証する。例えば Akt 抑制剤である LY294002 で前投与し Akt のシグナルを抑制して HIF-1 の発現やエネルギー代謝の変化を検証する。

3. 低酸素環境下におけるがん幹細胞における STAT3 のエネルギー代謝制御の確認

STAT3 が低酸素誘導因子を制御していることから、STAT3 にがん幹細胞のエネルギー代謝を制御する可能性を模索するため、唾液腺がん細胞株より STAT3 ノックダウン細胞株を作成する。そこから CD44 陽性細胞を MACS 磁気分離法により分取して shSTAT3 がん幹細胞を作成し、低酸素環境下における STAT3 とエネルギー代謝との関連を明らかにする。

4. がん幹細胞のエネルギー代謝を制御して効率的にアポトーシスに誘導する

癌細胞は本来エネルギー産生に最も効率的なミトコンドリア内クエン酸回路を回避し、アポトーシスに誘導されるのを巧みに逃れ、その代わり非効率でも解糖系を亢進させ、その他にも様々な代謝を変化させていることが知られている。そこで、ここまで明らかにした低酸素環境下におけるがん幹細胞のエネルギー代謝を制御している因子を標的にした抑制剤、薬剤を用い、がん幹細胞を有意にアポトーシスに誘導できるかを模索する。アポトーシスの仕様として PARP の切断化をウエスタンブロッティング法で観察、もしくはカスパーゼ 3/7 をルシフェラーゼ assay で定量する。

5. *in vivo* 腫瘍内微小環境におけるがん幹細胞のエネルギー代謝制御を試みる

マウスへの腫瘍移植モデルを用いて、腫瘍内のがん幹細胞の動態をがん幹細胞マーカーである CD44 を免疫組織染色、SOX-2、Oct3/4、などの腫瘍内の幹細胞を *in situ* ハイブリダイゼーションにて観察する。その上で、*in vitro* で明らかにしたがん幹細胞のエネルギー代謝制御を施行し効率的にアポトーシスが誘導されたか検証する。また同時に名古屋市立大学病院における臨床サンプルにおける仮説を検証する。

4. 研究成果

A-253 細胞株、NCU-SCD1 細胞株とも、CD44 陽性細胞を有する割合は極めて低かった。そのため、CD44 陽性細胞が十分な量が得られず、CD44 陰性細胞との比較は困難であった。そこで、頭頸部扁平上皮癌を含む様々な細胞株、初代培養株を用いて、CD44 陽性細胞の割合を検討した。CD44 陽性細胞を多く含む細胞株は、マウスに対する腫瘍造性能も良好であり、両者に関係があることが示唆された。マウス皮下腫瘍を作成したところ、CD44 陽性細胞を一部含み、接種した細胞が分化して腫瘍を形成していると考えられた。

現在、*in vitro* では CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞の性質の比較を行い、さらに CD44v 陽性細胞と陰性細胞の性質の比較を行っているところである。*in vivo* では CD44v 陽性細胞と腫瘍造性能の関係を検討しているところである。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 誠 (Adachi Makoto) (10468192)	朝日大学・歯学部・講師 (33703)	
研究分担者	江崎 伸一 (Esaki Shinichi) (20620983)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関