

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11401

研究課題名(和文) HPV-中咽頭癌における癌幹細胞の同定と転移・浸潤に関するシグナル経路の解明

研究課題名(英文) Isolation of Cancer Stem Cell and Identification of Signalling Pathway Related with Invasion and Metastasis in HPV- Oropharyngeal Cancer

研究代表者

グンデウズ メーメット (Gunduz, Mehmet)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70333507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中咽頭癌HPV()細胞株から癌幹細胞および癌非幹細胞群を分離し、免疫染色および癌幹細胞マーカー遺伝子発現により確認した。これらの癌幹細胞マーカー遺伝子は癌幹細胞群では2.7倍から5.1倍から増幅した。分離した各細胞株をMicroarray解析。Microarray解析結果として癌幹細胞株では癌非幹細胞株と比較してHiston Cluster蛋白コードする遺伝子の好発現を同定した。癌幹細胞群と癌非幹細胞群での増殖能力と化学療法感受性実験でMTTアッセイにより細胞増殖を確認した。シスプラチンを両方の細胞群に低量でも高量でも癌幹細胞群は化学物質に対して統計的に有意な抵抗があった

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌における癌幹細胞と化学・放射線治療耐性の関係が明らかにすればより効率的治療効果が得られる。

研究成果の概要(英文)：Isolated CSCs from HPV-negative OPC cell line, through magnetic activated cell sorting using CSC specific marker ALDH1 antibody, were characterized by sphere formation capacity, immunofluorescence staining, and CSC marker expression. CSC response to cisplatin treatment was evaluated via XTT-assay. Spheres of CSC of HPV-negative UTSCC-60A cell line were highly dark holospheres. RNA expression of CSC markers OCT4, SOX2, KLF4 and BMI1 were significantly higher in CSC. CSCs were significantly resistant to cisplatin treatment at various dosages as compared to nonCSC. HIST1H1T, TNSF18 and lin28 genes were detected to be candidate genes according to microarray data. HIST1H1T and TNSF18 have effect on CSC markers but this influence was not able to prevent CSC sphere formation and proliferation. lin28 gene had suppressed CSC markers and prevented CSC to form spheres which addresses this gene to be one of the candidate genes.

研究分野：頭頸部癌遺伝子解析

キーワード：頭頸部癌 中咽頭癌 HPV関連癌 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の急速な医療の進歩にも関わらず、頭頸部癌の生存率には大きな改善が見られない。この要因は、発癌と進行のメカニズムや治療後の再発および転移機序が解明できていない点にある。近年、発癌および再発・転移の原因として自己複製能と多分化能を持つ癌幹細胞の存在が提唱されている(癌幹細胞仮説)。癌幹細胞は抗癌剤や放射線に耐性を呈し、癌幹細胞の残存が治療後の再発・転移の主な原因と考えられている。頭頸部癌のなかでも中咽頭癌は、HPV(-)と(+)に分類され特にHPV(-)中咽頭癌の予後が不良であることが注目される。

2. 研究の目的

HPV(-)中咽頭癌に着目し、癌幹細胞を分離した後にMicroarray解析と分子生物学的検索によりシグナル経路を解明し、癌幹細胞を標的とした新治療のターゲット遺伝子を見出したい。

3. 研究の方法

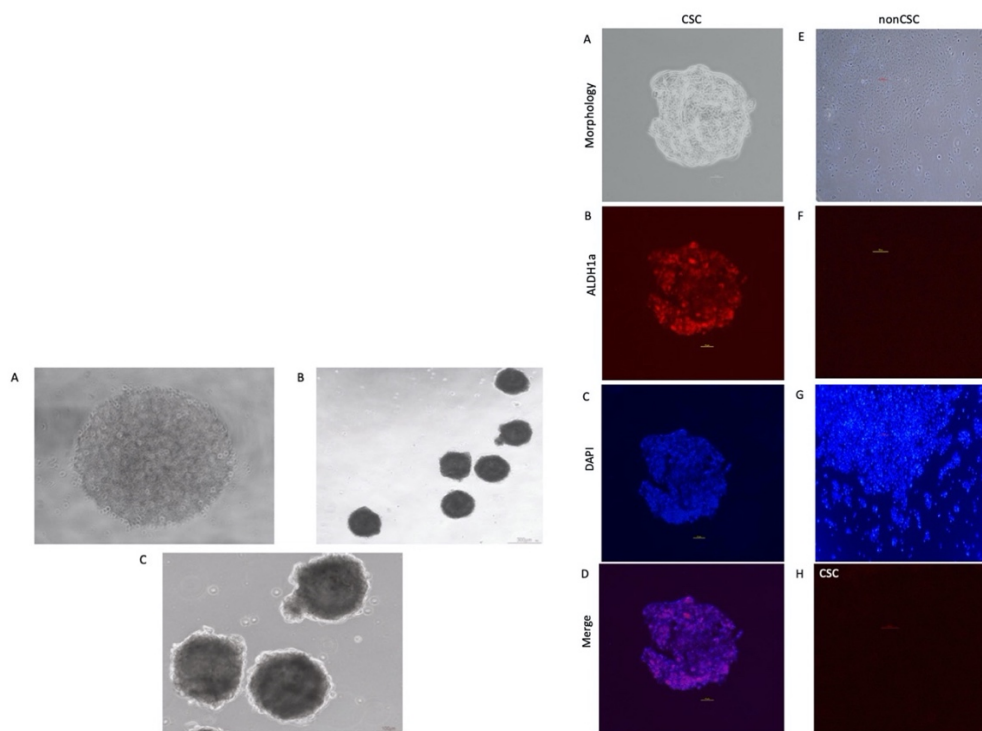
HPV(-)中咽頭癌細胞株を用いて癌幹細胞分離及び同定と特徴の検証

癌幹細胞株と非癌幹細胞株のMicroarray解析と分子生物学的検索

同定した遺伝子と癌幹細胞の関連の解析

4. 研究成果

培養した中咽頭癌 HPV (-) 細胞株である UTSCC-60A から癌幹細胞および癌非幹細胞(分化型細胞)群を分離し、TotalRNAを抽出しcDNA作成をした。分離した癌幹細胞をまた免疫染色および癌幹細胞マーカー遺伝子(Klf4、Sox2、CD133、Oct4)発現により確認した。これらの癌幹細胞マーカー遺伝子は癌幹細胞群では2.7倍から5.1倍から増幅した。



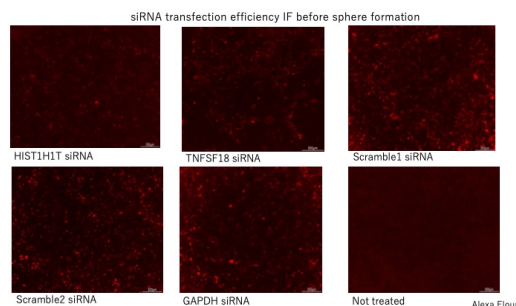
BMI発現は1.1倍で変化はなかった。分離した各細胞株をMicroarray解析(GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affimetrix) 24,838 genes and 11,086 linc RNA)を行った。Microarray解析結果として癌幹細胞株では癌非幹細胞株に比較してHiston Cluster蛋白コードする遺伝子の好発現を同定した。Histon Cluster遺伝子(H1、H2A、H2B、H3)のそれぞれプライマーを設定しReal-Time PCRでも癌幹細胞群では癌非幹細胞群に比較して発現過剰にしていることを確認しMicroarrayデータにも確認した。さらに癌幹細胞群と癌非幹細胞群での増殖能力と化学療法感受性について実験を行なった。MTTアッセイにより細胞増殖を確認した。シスプラチンを両方の細胞群に色々な量(0.3 1 2 5 microgram/mlから40 microgram/mlからまでのRange)で適用したところで定量でも高量でも癌幹細胞群は化学物質に対して統計的に有意な抵抗があった。現在Histon Cluster遺伝子のそれぞれに対してSiRNAをデザインしている。癌幹細胞で過剰発現しているHiston Cluster遺伝子をそれぞれ抑制し、癌幹細胞の特徴がなくなり、化学療法、放射線療法などの抵抗が克服できれば癌治療で大成功が得られる。Histon Cluster遺伝子に対してSiRNA実験により癌幹細胞の抑制を確認し、癌幹細胞の幹細胞特徴がなくなって

いることの実験 (Sphere FormationアッセイでSphere 消失、ALDH 1 A染色消失、癌幹特徴遺伝子発現低下など)。Histon Cluster遺伝子抑制で化学療法物質 (シスプラチン) に対して感受性の変化があるかどうかの確認実験。Matrigel Invasionアッセイにし癌幹細胞の浸潤能力などの変化があるかどうかの確認実験を行なった。

HIST1H1T、TNSF18 および lin28 遺伝子は、HPV (-) 中咽頭癌細胞株 UTSCC 60A (HIST1H1T および TNSF18 低発現、lin28 高発現) のマイクロアレイデータによると候補遺伝子であることが検出されました。これらの遺伝子が癌幹細胞 (CSC) に影響を与えるかどうかを評価するには 1) CSC の球形形成能力、2) CSC マーカーの発現と 3) 細胞増殖アッセイが計画した。HIST1H1T および TNSF18 siRNA がデザイン作成し、CSC にトランスフェクトまたは CSC が lin28 阻害剤である C1623 で処理した。

1.スライド : HIST1H1TsiRNA および TNSF18siRNA のトランスフェクション効率を確認するために、MACSにより UTSCC-60A 細胞株から CSC を分離し、抗生物質を含まない CSC 培地を含む 24 ウェル組織培養プレートに 1×10^5 CSC/ウェルを plating した。1 日後、CSC がウェルの表面に付着した。トランスフェクションは、HIST1H1T siRNA、TNSF18 siRNA、およびコントロール (scramble1 siRNA、scramble2 siRNA、GAPDH siRNA、および未処理のウェル) について、次のように実行した。

各 siRNA のトランスフェクション手順 : A. 3ul の Lipofectamine®RNAiMAX 試薬を 50 ul の OPTIMEM で希釈した。B. 1ul の siRNA (10pmol) を 50ul の OPTIMEM で希釈
A と B を室温で 5 分間一緒にインキュベートし、この混合物の 50ul を各ウェルに加えた (合計 2 ウェル)。1ul の BLOCK-iT AlexaFluor®Red Fluorescent Oligo 試薬を使用して、siRNA とともに各ウェルにトランスフェクトされたトランスフェクション効率を測定した。1 日後、すべてのウェルは、各 siRNA の細胞内の赤色蛍光色素の検出でトランスフェクションが効率的であり、未処理の場合、細胞内に赤色蛍光色素がなかったことを示した。



2.スライド CSC 球における HIST1H1T siRNA および TNSF18 siRNA のトランスフェクション効率を確認するため、MACSにより UTSCC-60A 細胞株から CSC を分離し、抗生物質を含まない CSC 培地で 96 ウェル組織培養プレート (U 底) に 0.3×10^4 CSC/ウェルで播種した。5 日後、CSC が球体を形成し、各 HIST1H1T siRNA、TNSF18siRNA、およびコントロール (scramble1 siRNA、scramble2 siRNA、GAPDH siRNA、および未処理のウェル) に対して以下のようにトランスフェクションを行った。

各 siRNA のトランスフェクション手順 : C. 1.5ul の Lipofectamine®RNAiMAX 試薬を 25 ul の OPTIMEM で希釈 D. 0.5ul の siRNA (10pmol) を 25ul の OPTIMEM で希釈
A と B を室温で 5 分間一緒にインキュベートし、この混合物の 10ul を各ウェルに追加した (合計 3 ウェル)。1ul の BLOCK-iT AlexaFluor®Red Fluorescent Oligo 試薬を使用して、siRNA とともに各ウェルにトランスフェクトされたトランスフェクション効率を測定した。1 日後、す

すべてのウェルは、各 siRNA の細胞内の赤色蛍光色素の検出でトランスフェクションが効率的であり、未処理の場合、細胞内に赤色蛍光色素がなかったことを示した。これですべてのウェルは、トランスフェクションが各 siRNA の細胞内の赤色蛍光色素の検出で効率的であり、未処理の場合、細胞内に赤色蛍光色素がなかったことを確認した。

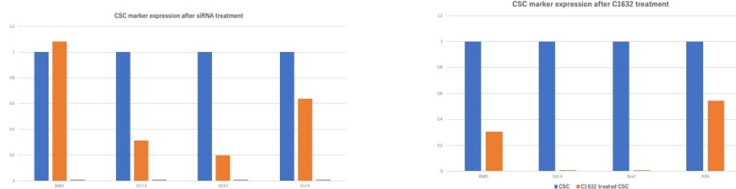


3.スライド HIST1H1T siRNA のトランスフェクション効率も qPCR によって確認した。HIST1H1T siRNA、scramble1 siRNA、および scramble2 siRNA を異なるウェルの CSC にトランスフェクションした後、各 siRNA の各ウェルから RNA を単離した。次に、製造元のプロトコルに従って、RevertAid First Strand cDNA 合成キット、Thermo Fisher Scientific によって RNA が cDNA に変換された。Syber Green は、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムでの qRT-PCR 反応に使用された。Quadruplicate (四連) のサンプルを使用し、qPCR を 2 回繰り返した。HIST1H1T siRNA でトランスフェクトされたサンプルでは HIST1H1T の発現を検出できず、scramble1 siRNA および scramble2 siRNA でトランスフェクトされたサンプルでは HIST1H1T の発現が検出されたため、トランスフェクションは qPCR を通じて効率的であることが確認した。



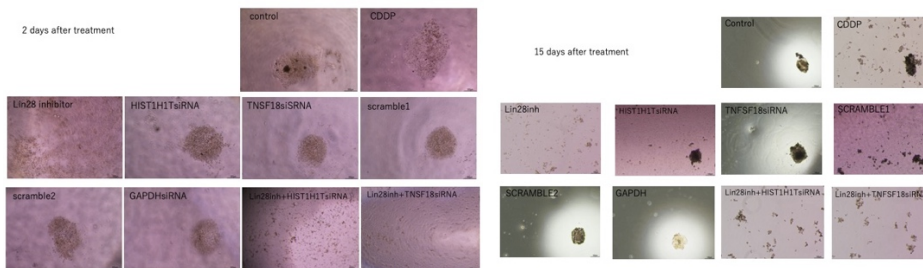
4.スライド:TNSF18 siRNA のトランスフェクション効率も qPCR によって確認した。TNSF18 siRNA、scramble1 siRNA、および scramble2 siRNA を異なるウェルで CSC にトランスフェクションした後、各 siRNA の各ウェルから RNA を単離した。次に、製造元のプロトコルに従って、RevertAid First Strand cDNA 合成キット、Thermo Fisher Scientific によって RNA が cDNA に変換された。Syber Green は、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムでの qRT-PCR 反応に使用した。Quadruplicate (四連) のサンプルを使用し、qPCR を 2 回繰り返した。TNSF18 の発現は scramble1 及び 2 siRNA のトランスフェクションされたサンプルで検出されたが、TNSF18 の発現は TNSF18 siRNA でトランスフェクションされたサンプルで 50%抑制され、トランスフェクションは qPCR を通じて効率的であることが確認した。

5.スライド：トランスフェクションが効率的であることを確認した後、qPCR による CSC マーカー発現分析を続けた。RNA を単離し、cDNA に変換し、それぞれの未処理の CSC、HIST1H1T siRNA をトランスフェクトした CSC、および TNSF18 siRNA をトランスフェクトした CSC から qPCR を行った。qPCR の結果は、HIST1H1T siRNA が CSC マーカー BIM1、OCT4、SOX2、および KLF4 を完全に抑制することを示した。TNSF18 siRNA は、CSC マーカー OCT4 70%、SOX2 80%、および KLF4 をほぼ 50%抑制したが、CSC マーカー BIM1 を抑制できなかった。



6.スライド：CSC に対する lin28 の影響を検出するために、CSC を 10uM の C1632 (lin28 阻害剤) で処理し、RNA をこれらから分離した。結果は、C1632 が CSC マーカー-OCT4 および SOX2 を完全に抑制し、BIM1 が 70%、KLF4 が 45%抑制であることを示した。

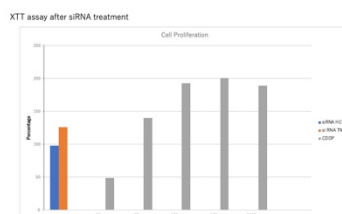
7.スライド：CSC 球の形成に対する HIST1H1T siRNA、TNSF18 siRNA、および C1632 の影響を調査した。CSC 分離後、1 ウェルあたり 2×10^3 CSC を培養する様に、96 ウェル組織培養プレートに播種した。播種中、CSC は HIST1H1T siRNA、TNSF18 siRNA、C1632、scramble1 及び 2 siRNA、GAPDH siRNA、シスプラチンで処理され、未処理のウェルはネガティブコントロールとして残された。48 時間後の結果は、lin28 阻害剤で処理されたサンプルのみが球体を形成できないことを示した。他のすべてのサンプルは、播種の 2 日目に CSC 球を形成した。



8.スライド：15 日の播種後、球体形成の結果は変化しなかったが、lin28 阻害剤で処理されたサンプルは球体を形成しなかった。他のすべてのサンプルは球体を形成した。

9.スライド：シスプラチンの各投与量、および HIST1H1T siRNA と TNSF18 siRNA で処理された 3 つのサンプルを 5×10^3 細胞/ウェルとして 96 ウェル組織培養プレートに播種し、5%CO₂ と 37°C でインキュベートした。シスプラチン投与量は 50µg/ml ~ 0.3125µg/ml で使用した。50ul の XTT (Roche) アッセイを各ウェルに加え、4 時間のインキュベーション後にマイクロプレートリーダー Corona SH-9000Lab を使用して 490~660 nm で吸光度を読み取った。バックグラウンドは、培地のみを含むウェルの平均を通して測定した。

結果は、HIST1H1T siRNA および TNSF18 siRNA がシスプラチンの投与量 25µg/ml-0.3125µg/ml よりも細胞増殖を低下させた一方で、この低下は細胞増殖を 50%に抑制するには不十分であることを示した。



結論として、HIST1H1T と TNSF18 が CSC マーカーに影響を与えることを示したが、この影響は CSC 球体形成と増殖を防ぐことができなかった。これは、HIST1H1T と TNSF18 遺伝子を変更できない別の CSC マーカーがある可能性を示唆している。

lin28 遺伝子は CSC マーカーを抑制し、CSC が球体を形成するのを防ぎ、この遺伝子が CSC に影響を与える可能性のある候補遺伝子の 1 つであることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mehmet Gunduz, Esra Gunduz, Shunji Tamagawa, Keisuke Enomoto, Muneki Hotomi	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Identification and chemoresistance of cancer stem cells in HPV negative oropharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 965-971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/ol.2019.11127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Esra Gunduz, Mehmet Gunduz, Shunji Tamagawa, Keisuke Enomoto, Muneki Hotomi
2. 発表標題 Characterization of Cancer Stem Cell in HPV-negative Oropharyngeal Cancer
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 グンデゥズ メーメット、グンデゥズ エスラ、玉川俊次、保富宗城
2. 発表標題 HPV 中咽頭癌における癌幹細胞の同定と特徴の証明
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2018年

〔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	玉川 俊次 (TAMAGAWA SHUNJI) (40543781)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	戸川 彰久 (TOGAWA AKIHISA) (70305762)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究 分担者	保富 宗城 (HOTOMI MUNEKI) (90336892)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究 協力者	グンデウズ エスラ (GUNDUZ ESRA) (20812887)	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科・博士研究員 (24701)	
研究 協力者	榎本 圭佑 (ENOMOTO KEISUKE) (30805750)	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科・講師 (24701)	