

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19760

研究課題名(和文)人工口腔癌幹細胞の作製とその性状解析による新たな研究基盤の確立

研究課題名(英文) Study on the generation of oral cancer stem cell and analysis of its nature

研究代表者

工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：50314753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞は治療抵抗性により再発の原因となる。よって、癌幹細胞の除去は、転移や再発の防止に有用な治療法になりうる。これまでに、口腔癌幹細胞の存在や性質も含めて多くのことが明らかにされていない。本研究では、口腔癌細胞にEmi1を過剰発現させ、APC/Cを恒常的に活性低下させることにより胚性幹細胞の細胞周期制御を再現し、人工的口腔癌幹細胞(iOCS)を作製することを試みた。実際に、iOCS細胞は、増殖の低下、細胞周期におけるG1期の短縮およびS期の延長および幹細胞マーカーの発現増加などの幹細胞の性質を有することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、自己複製能や多分化能を有する癌幹細胞の存在が明らかとなり、癌幹細胞を起源として癌が発生すると考えられている。実際に、白血病や脳腫瘍、大腸癌、乳癌などの癌で幹細胞が発見されているが、口腔癌幹細胞に関する研究は他臓器の癌に比べて遅れており、未だその存在や性質は明らかにされていない。本研究で作製した「人工口腔癌幹細胞」の性状を詳細に検討することにより、将来の口腔癌幹細胞に関する研究基盤になることが期待される。さらに、本研究成果は口腔癌における新規の診断マーカーや抗がん剤の開発につながるものが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells cause relapse by treatment resistance. Therefore, removal of cancer stem cells is considered to be a useful therapeutic method for preventing metastasis and recurrence. So far, much, the nature and its presence of oral cancer stem cells have not been clarified. In the present study, artificial oral cancer stem cells (iOCS) were generated via constitutively inactivating APC/C by overexpression of Emi1 in oral cancer cells to mimic the cell cycle control of embryonic stem cells. We found that the iOCS cells had stem cell properties such as reduced proliferation, shortened G1 phase and longer S phase in the cell cycle, and increased expression of stem cell markers.

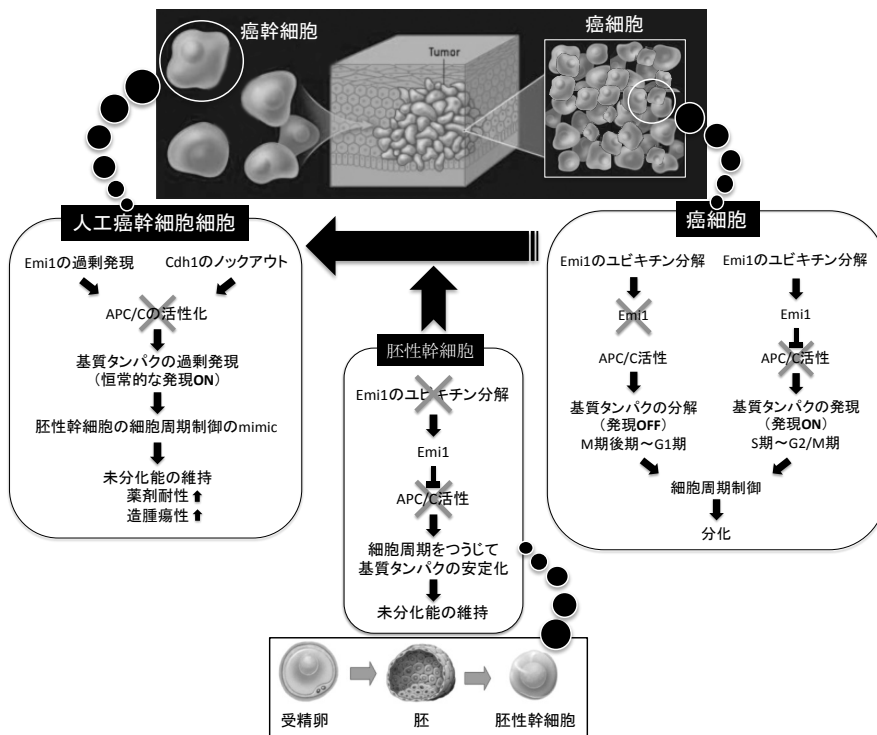
研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 癌幹細胞 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

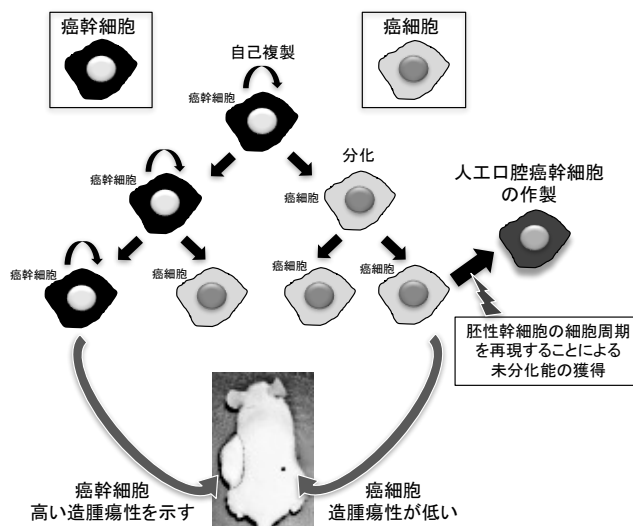
超高齢化社会を迎える我が国では今後益々、口腔癌の発生率の増加が予想される。我が国では、口腔癌の発生率は全癌の約3%であるが、西アジア諸国では、全身に発生する癌の中で頻度が最も高いなど、世界的に頻度の高い癌の一つとされている。QOLの低下が著しい口腔癌に対して、早期発見や進展の予防のための新たな診断法や審美的・機能的損失を軽減する治療法の開発は社会的に早急に望まれている。癌幹細胞は抗がん剤に対する耐性や排出による治療抵抗性を示し、生き残った癌幹細胞が再発の原因となる。よって、癌幹細胞の除去や分化誘導による自己複製能の消失は、転移や再発の防止に有用な治療法になりうると考えられる。これまでに、口腔癌における幹細胞の存在や性質も含めて多くのことが明らかにされておらず、実験的にも口腔癌幹細胞は作製されていない。



最近、胚性幹細胞において Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) の基質タンパクの発現が高いことが示され、APC/C inhibitor である Emi1 により APC/C の活性が抑制されているために、基質タンパクの高発現が認められることが報告された。実際に、胚性幹細胞における APC/C の基質タンパクである Aurora-A や Geminin のノックダウンは、分化を誘導することから、APC/C の活性低下が胚性幹細胞の未分化能維持に重要な役割を果たすことが推測される。申請者は、これまでに細胞周期調節因子のユビキチン分解制御機構に着目し、基質タンパクの探索やその分解機構の詳細、さらにその制御異常による癌化について研究を続けてきた。特に、申請者らは、1) APC/C inhibitor である Emi1 が SCF<sup>βTrcp</sup> によりユビキチン分解制御を受けること (Dev Cell 2003)、2) Emi1 のノックダウンが複製を誘導し、抗がん剤の感受性を増強させること (J Biol Chem 2013)、3) 分裂期における Aurora-A を介した Geminin のリン酸化が APC/C による分解を阻害し、安定性化した Geminin が複製前複合体 (pre-RC) 形成に重要な役割を果たすこと (Nat Commun 2013) を報告している。そこで、申請者らはこれまでの知見から、実験的に口腔癌細胞に Emi1 を過剰発現させることや Cdh1 をノックアウトすることで、APC/C を恒常的に活性低下させ、胚性幹細胞の細胞周期制御を再現することで、癌幹細胞を作り出すことができるのではないかと考え、本研究構想に至った (上図参照)。

2. 研究の目的

幹細胞は、分裂して自分と同じ細胞を作り出す自己複製能や様々な細胞に分化できる多分化能を持っている。一方癌細胞は、正常細胞に比較して高い増殖能、不死化、周辺組織への浸潤や離れた部位への転移という特徴を持っているが、癌組織を構成する全ての癌細胞がこれらの特徴を兼ね備えているわけではない。これらの特徴を持った癌細胞が、「自己複製能」と「多分化能」を有する「癌幹細胞」と考えられており、癌の発生のみならず、転移のメカニズムや治療法を考える上で重要とされる (右図参照)。特に、癌幹細胞は抗がん剤に対する耐性や



排出による治療抵抗性を示し、生き残った癌幹細胞が再発の原因となる。よって、癌幹細胞の除去や分化誘導による自己複製能の消失は、転移や再発の防止に有用な治療法になりうると考えられる。本研究では口腔癌細胞において、Emi1 の過剰発現あるいは Cdh1 のノックアウトにより APC/C の活性を恒常的に抑制し、胚性幹細胞の細胞周期調節を再現することにより、人工的に口腔癌幹細胞の作製を試みる。さらに、その性状を詳細に解析することにより、新たな診断・治療法の開発のための基盤を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、右図のように口腔癌細胞株に Emi1 の過剰発現あるいは Cdh1 のノックアウトにより APC/C 活性を恒常的に抑制し、人工的に癌幹細胞が作製できるかを検討し、その性質を詳細に解析する。最終的には、作製した人工口腔癌幹細胞に特異的に発現する因子を同定する。具体的には、以下のように計画を実行する。

#### (1) 人工口腔癌幹細胞 (induced Oral Cancer Stem Cell: iOCS) の作製

口腔癌細胞株にレンチウイルスベクターを用いて、Emi1 を過剰発現させ、安定性に Emi1 を発現する細胞を作製する。また、APC/C は、アダプター因子である Cdh1 を介して基質タンパクに結合し、ユビキチン化することから、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により Cdh1 をノックアウトした細胞を作製する。これら細胞を人工口腔癌幹細胞 (iOCS) とする。(もし、上記方法で口腔癌幹細胞が作製できない場合は、薬剤や他の因子を用いて APC/C 活性の恒常的な阻害を試みる)

#### (2) iOCS における APC/C の活性低下の検討

上記で作製した iOCS (Emi1 過剰発現および Cdh1 ノックアウト口腔癌細胞) における APC/C の活性低下を検討する。APC/C の活性は、基質タンパクである Aurora-A、Skp2、Cyclin A、Cyclin B、Geminin などの発現量および *in vivo* におけるユビキチン化能により検討する。APC/C の活性低下を確認後、これら細胞の幹細胞としての性質を詳細に検討する。

#### (3) iOCS における細胞周期調節の検討

胚性幹細胞では、細胞周期における S 期の延長と G1 期および G2 期の短縮が見られることから、iOCS 細胞における細胞周期の cell population をフローサイトメトリーで調べる。さらに、ノコダゾールを投与することにより細胞を分裂期に同調させ、細胞周期の進行をコントロール細胞と比較することにより、S 期の延長と G1 期および G2 期の短縮を検討する。

#### (4) iOCS における薬剤耐性・排出能および造腫瘍性の検討

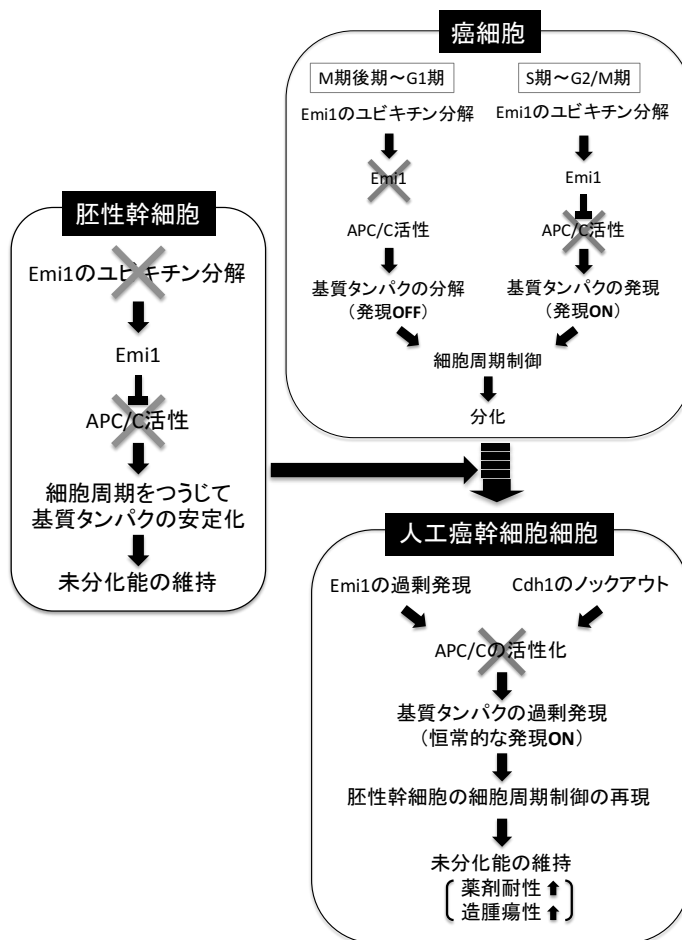
iOCS 細胞とコントロールの口腔癌細胞に種々の抗がん剤 (アドリアマイシン、シスプラチン、5-FU) を投与し、アポトーシスをおこした細胞をフローサイトメトリーにより検討し、抗がん剤に対する薬剤耐性を比較検討する。また、Rhodamin-123 の取り込みによる薬剤排出能試験を行う。さらに、iOCS 細胞をヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍の大きさをモニターすることによる造腫瘍性を調べる。また、マウスにできた腫瘍を採取し、組織学的に検討する。

#### (5) iOCS における幹細胞関連因子の発現の検討

iOCS 細胞における幹細胞関連因子の発現を qPCR アレイ (RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Stem Cell) を用いて網羅的に検討する。

#### (6) iOCS に特異的に発現する因子の同定

iOCS 細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより調べ、iOCS 細胞に共通して発現する因子を同定する。同定した因子を口腔癌幹細胞関連候補因子とする。



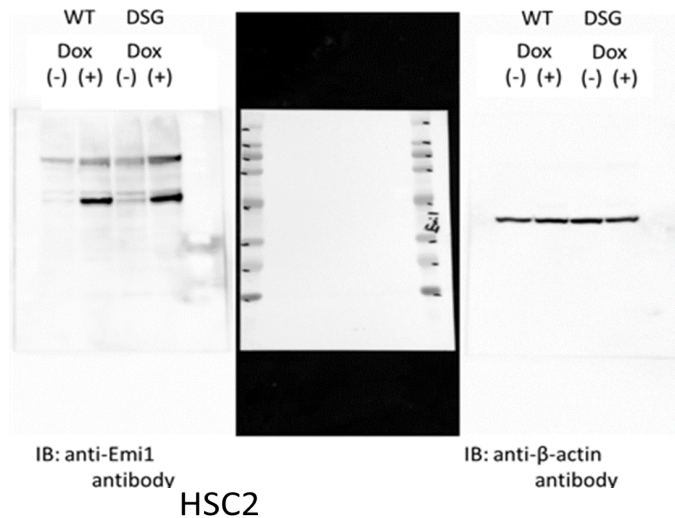
## (7) 研究の総括

本研究成果を総括し、iOCS を用いた新規研究基盤に関して考察する。さらに、iOCS を用いて明らかにした口腔癌幹細胞関連候補因子の口腔癌に対する新規抗癌剤の開発や診断・治療への応用について考察する。

### 4. 研究成果

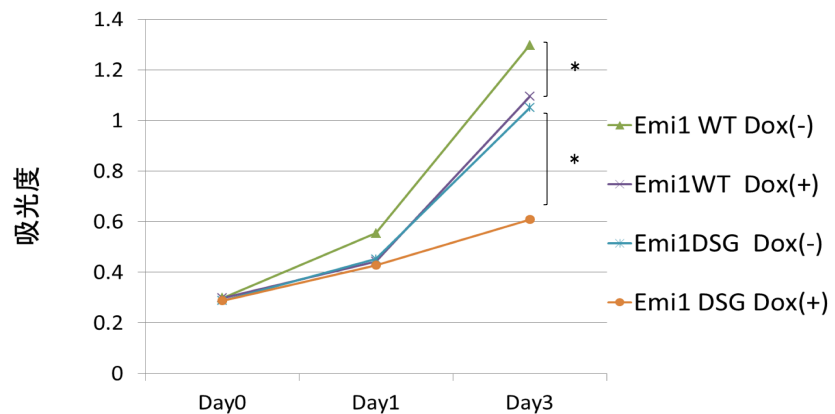
#### (1) iOCS の作製

口腔癌細胞株にレンチウイルスベクターを用いて、Emi1 を過剰発現させ、安定性に Emi1 を発現する細胞を作製するために、テトラサイクリン誘導性に Emi1 を過剰発現させるレンチウイルスベクターを用いた。Emi1 は、体細胞の細胞周期では、分裂期初期から G1 期までは、SCP<sup>βTrcp</sup> によりユビキチン分解され、発現しない。βTrcp は Emi1 の<sub>144</sub>DSGYSS<sub>149</sub> という配列を認識し、145 番目のセリン残基および 149 番目のセリン残基のリン酸化を介して結合する。そこで、145 番目のセリン残基および 149 番目のセリン残基をアラニン残基に置換させた非分解型変異体である S145A/S149A 変異体 (Emi1 DSG) を作成した。レンチウイルスベクターである CSIV-TRE-UbC-puro-T2A-rtTA に野生型 Emi1 (Emi1 WT) および非分解型 Emi1 (Emi1 DSG) を組み込み、レンチウイルスベクターとパッケージングプラスミドを 293LTV 細胞 (Cell Biolabs Inc.) に XtremeGENE HP (Roche) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、培養上清を回収し、フィルター (0.45 μm) に通して、4 μg/ml polybrene とともに、口腔癌細胞株である HSC2 細胞に感染させた。また、APC/C のアダプター因子である Cdh1 を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックアウトした細胞を作製することを試みたが、うまくいかなかった。テトラサイクリン誘導性に野生型あるいは非分解型 Emi1 を過剰発現させた口腔癌細胞を iOCS とした。実際に、右図に示すように iOCS 細胞は、テトラサイクリンの投与により、Emi1 の発現が誘導されることを確認した。



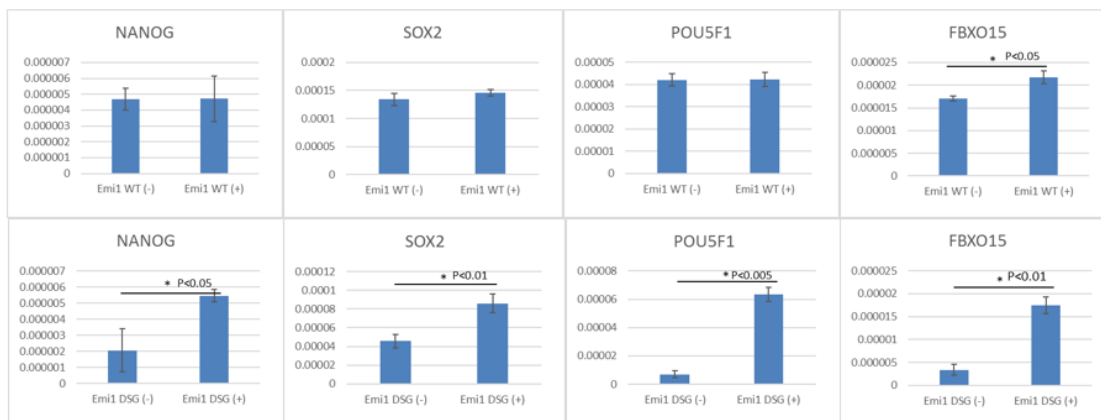
#### (2) iOCS の増殖の検討

テトラサイクリン誘導性に野生型あるいは非分解型 Emi1 を過剰発現させた口腔癌細胞である iOCS の増殖を Cell Counting Kit-8 (CCK-8; 同仁化学研究所) を用いて検討した。右図に示すように iOCS 細胞は、テトラサイクリンの投与により、Emi1 の分解抑制型変異体は、野生型に比べて増殖能が遅く、幹細胞の性質を有していた。



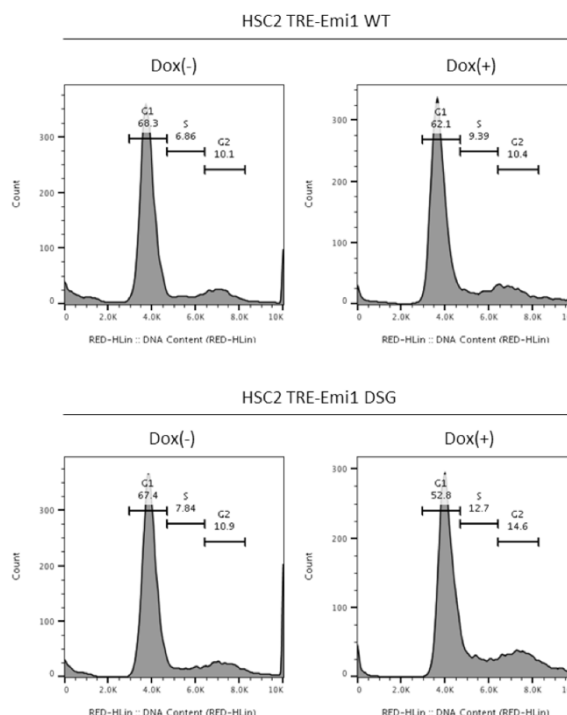
#### (3) iOCS における幹細胞関連因子の発現

テトラサイクリン誘導性に野生型あるいは非分解型 Emi1 を過剰発現させた口腔癌細胞である iOCS における幹細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR で検討した。幹細胞マーカーである NANOG、SOX、POU5F1 (Oct3/4) および FBX015 の発現を特異的プライマーを用いて検討した。非分解型 Emi1 の過剰発現は、NANOG、SOX2、POU5F1、FBX015 の発現上昇を認めた (下図参照)。野生型 Emi1 の過剰発現は、FBX015 のみの発現上昇が見られた。興味深いことに、Emi1 の分解抑制型変異体の方が、野生型に比べて幹細胞マーカーの発現が高かった。



#### (4) iOCS における細胞周期調節の検討

iOCS 細胞における細胞周期の cell population をフローサイトメトリーで調べた。右図に示すように、野生型 Emi1 の過剰発現は G1 期の細胞の population が 68.3% から 62.1% に減少し、S 期の細胞の population が 6.86% から 9.39% と増加した。非分解型 Emi1 の過剰発現は、G1 期の細胞の population が 67.4% から 52.8% に減少し、S 期の細胞の population が 7.84% から 12.7% と増加し、野生型 Emi に比べて G1 期の細胞割合の減少と S 期の細胞の増加が認められ、胚性幹細胞における細胞周期制御によく似ていることが明らかになった。今後は、細胞周期をノコダゾールを用いて分裂期に同調させ、細胞周期の進行をコントロールの細胞と比較することにより、S 期の延長と G1 期および G2 期の短縮を詳細に検討する。



現在、iOCS 細胞における APC/C の活性低下を基質タンパクである Aurora-A、Skp2、Cyclin A、Cyclin B、Geminin などの発現量および *in vivo* におけるユビキチン化能により検討している。また、iOCS 細胞とコントロールの口腔癌細胞に種々の抗がん剤（アドリアマイシン、シスプラチン、5-FU）を投与し、アポトーシスをおこした細胞をフローサイトメトリーにより検討し、抗がん剤に対する薬剤耐性を比較検討している。

以上に示すように、我々は、口腔癌幹細胞モデルとして iOCS 細胞を樹立し、幹細胞様性質を有することを明らかにした。今後は、この細胞のさらなる解析を進め、特異的なマーカーの検索などを行いたいと考えている。

	G1	S	G2/M
WT(-)	68.3	6.86	10.1
WT(+)	62.1	9.39	10.4
DSG(-)	67.4	7.84	10.9
DSG(+)	52.8	12.7	14.6

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① **Kudo, Y\***. Predicting cancer outcome: Artificial Intelligence vs Pathologists. *Oral Diseases* 25(3):643-645, 2019. doi: 10.1111/odi.12954. \*Corresponding author 査読あり
- ② **Qi, G., Liu, J., Mi, S., Tsunematsu, T., Jin, S., Shao, W., Liu, T., Ishimaru, N., Tang, B., Kudo, Y\***. Aurora kinase inhibitors in head and neck cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 18(3):199-213, 2018. doi: 10.2174/1568026618666180112163741. \*Corresponding author 査読あり
- ③ **Siriwardena, B.S.M.S., Tsunematsu, T., Ishimaru, N., Kudo, Y\***. Invasion related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma- A review. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1462, 2018. doi: 10.3390/ijms19051462. \*Corresponding author 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 特別講演：細胞周期調節を標的としたがん幹細胞の分化誘導とその臨床応用の可能性。工藤保誠。2018 先端医学研究交流セミナー「がん・白血病～先端研究の現状～」(徳島市)，

2018年8月31日.

- ② Emi1 の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成. 西條 早紀, 大塚 邦紘, 常松 貴明, 大塚 邦紘, 牛尾 綾, 新垣 理恵子, 工藤 保誠, 石丸 直澄. 第 107 回日本病理学会総会 (札幌市) 2018 年 6 月 21-23 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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 : 石丸 直澄

ローマ字氏名 : ISHIMARU, Naozumi

所属研究機関名 : 徳島大学

部局名 : 大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 60314879

研究分担者氏名 : 常松 貴明

ローマ字氏名 : TSUNEMATSU, Takaaki

所属研究機関名 : 徳島大学

部局名 : 大学院医歯薬学研究部 (医学域)

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 70726752

### (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。