

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09736

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における癌幹細胞マーカーの解析と新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) NF- $\kappa$ B correlates with stemness characteristics and metastasis in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

大西 祐一 (Ohnishi, Yuichi)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70322568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)臨床サンプルにおいて癌幹細胞(CSC)の指標にも考えられているNF- $\kappa$ Bとc-Metの免疫組織化学的発現を評価した。さらに、OSCC細胞を用いて、口腔OSCCの上皮間葉転換(EMT)そして遊走能に対するNF- $\kappa$ Bとc-Met阻害の影響を分析した。NF- $\kappa$ Bとc-Metの免疫組織化学的染色では腫瘍のinvasion frontで強く発現した。また、OSCC細胞においては両者の発現がみられ、特に癌幹細胞様性質を示すKBで明らかな発現がみられた。そしてNF- $\kappa$ Bおよびc-Met阻害により、EMTに関与する遺伝子の発現と遊走能を効果的に阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臨床において口腔扁平上皮癌の分子レベルでの個体差を把握し治療法を決定することはなく、臨床的所見や経験に基づくところが大きい。そこで本研究では、NF- $\kappa$ Bおよびc-Metの口腔扁平上皮癌における役割を明確にし、癌幹細胞マーカーとして治療法決定の際の指標とすることは、長年の目標である生存率の改善に大きく貢献するものと思われる。さらにNF- $\kappa$ B阻害剤やc-Met阻害剤により、NF- $\kappa$ Bおよびc-Met発現を制御し、癌幹細胞性を抑制することで、新たな分子標的因子としての遺伝子治療へと応用できる可能性が示唆された。このことは学術的、社会的意義があり優れていると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, We evaluated the immunohistochemical expression of NF- $\kappa$ B and c-Met, which is also considered as an indicator of cancer stem cell (CSC), in oral squamous cell carcinoma(OSCC) clinical samples. Moreover, analysed the effects of NF- $\kappa$ B and c-Met inhibition on migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) using western blot analysis and knockdown by NF- $\kappa$ B and c-Met inhibitor in oral CSCs. Immunohistochemical staining of NF- $\kappa$ B and c-Met strongly expressed in the invasion front of the tumor cells. In OSCC cell lines, expression was observed in HSC3, HSC4 and KB, and in particular, phosphorylated NF- $\kappa$ B and c-Met was clearly expressed in KB which showing stem cell-like property. Inhibition of NF- $\kappa$ B and c-Met by inhibitor effectively inhibits the expression of genes involved in the EMT, and the migration of OSCCs.

研究分野：外科系歯学分野

キーワード：口腔扁平上皮癌 癌幹細胞 幹細胞マーカー c-Met NF- $\kappa$ B

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 現在、口腔扁平上皮癌を制御するために手術や放射線療法、化学療法そして分子標的治療薬などの様々な治療法が進歩しているが、完全な制御には至っておらず、ここ 30 年間で 5 年生存率の著しい改善は認められていない。最近の研究では癌細胞が自己増殖だけでなく、癌の進展中に様々な系統の成熟した細胞への分化も行うことが明らかになってきており、その中心と考えられるのが、自己複製能 (self-renewal)、多分化能を備える癌幹細胞である。本研究では癌幹細胞に着目した。
- (2) 申請者らはすでに、口腔扁平上皮癌臨床サンプルにおいて癌幹細胞の指標の一つである Nanog の発現が分化能や転移能、化学放射線療法抵抗性と関係する可能性を示している。また、申請者はヒト口腔扁平上皮癌細胞株である SAS が癌幹細胞性を備えており、分子標的薬 (cetuximab) に対して抵抗性を持つことを証明した。そして、SAS は、単層培養条件下で EGFR は発現しリン酸化されているものの、増殖は血清非依存的かつ cetuximab 耐性であり、浮遊培養条件下の aggregate の増殖は血清依存的かつ cetuximab 感受性に変わることを示した。すなわち、環境の変化によって SAS の cetuximab 感受性が変わり、効果を示すことが分かった。さらに、SAS の単層培養と浮遊培養における EGFR シグナル伝達制御の違いを分子レベルで示した。
- (3) 一方、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の遊走には血清成分が関与しており、SAS の遊走には EGF-EGFR MEK pathway 下で cofilin を介したアクチン重合制御が重要な役割を果たし、HSC4 の遊走には、EGFR 以外の Akt pathway 刺激が必要であることを示した。
- (4) 申請者らは癌幹細胞の指標の一つである c-Myc を発現制御することで SAS の幹細胞性が抑制されることも確認している。すなわち、SAS における癌幹細胞の分化能や転移能、化学放射線療法抵抗性に関する役割を明確にすることは手術や化学療法、放射線療法、化学放射線療法といった治療法決定に際して有効であり、更に口腔扁平上皮癌の転移の制御にもつながると考えられる。

### 2. 研究の目的

- (1) 現在、臨床の場において口腔扁平上皮癌における分子レベルでの個体差を把握し治療法を決定することはなく、臨床的所見や経験に基づくところが大きい。本研究で癌幹細胞の口腔扁平上皮癌における役割を明確にし、癌幹細胞マーカーを特定し、治療法決定の際の指標とすることは、長年の目標である生存率の改善に大きく貢献するものである。
- (2) さらに癌幹細胞を発現制御することにより、癌幹細胞性を抑制し、新たな分子標的因子としての遺伝子治療へと応用できる可能性を探るため。

### 3. 研究の方法

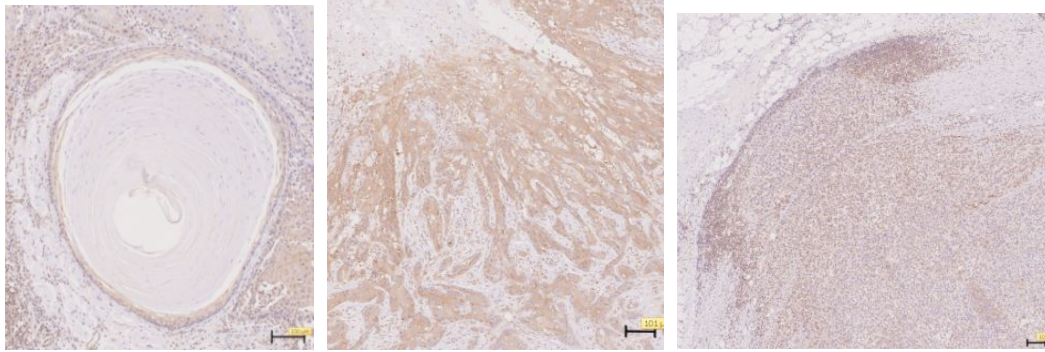
- (1) すでに行っている免疫組織染色を用いた口腔扁平上皮癌臨床サンプルにおける癌幹細胞マーカーと考えられる NF- $\kappa$ B および c-Met 発現の解析の総数を増やし臨床的特徴 (分化度やリンパ節転移の有無、Stage の進行度、化学放射線療法抵抗性等) との関係性を評価する。そして、口腔扁平上皮癌培養細胞における癌幹細胞マーカーと考えられる NF-

B および c-Met の解析や化学療法抵抗性の関係を明らかにし、NF- $\kappa$ B および c-Met の発現を抑制する化学療法のレジメンを作製する。

- (2) 1997 年から 2015 年の間に当科にて手術を行った口腔扁平上皮癌患者 80 例を対象とし、原発巣は生検時に採取した組織を使用。なお、本研究はすでに本大学医の倫理委員会の承認を受けている。
- (3) 免疫組織染色と評価方法:切片は通常に従い脱パラフィンを行った後、抗原を Tris-EDTA buffer (pH 9.0)中で賦活化。ブロッッキング後、300 倍希釈した抗 NF- $\kappa$ B および c-Met ヤギポリクローナル抗体 (Abnova) を 1 次抗体として反応させ、ペルオキシターゼを標識し、ImmPRESS<sup>®</sup>で反応させた後、DAB にて発色。ヘマトキシリンで核染色し、観察を行う。それぞれのサンプルを半定量的にスコア化 [強度 (1, weak; 2, moderate; 3, strong) と 1000 個の癌細胞における陽性率 (1, <25%; 2, 25-50%; 3, 51-75%; 4, >75%) の合計] し評価を行う (+, 2-3; ++, 4-5; +++, 6-7 とする)。検定は Mann-Whitney U test にて行い、the mean  $\pm$  SD, *P* values<0.05 を有意差ありとする。
- (4) 口腔癌培養細胞は癌幹細胞性を持つヒト口腔扁平上皮癌細胞株である SAS および KB と癌幹細胞性を持たない HSC3, HSC4 (RIKEN BioResource Center) を使用する。
- (5) ウェスタンブロットティング:細胞をプラスチックシャーレにて培養し、semi-confluent の状態の細胞からタンパク質を RIPA Buffer にて回収した後、BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量を行う。抗体は抗 Nanog および c-Myc ウサギポリクローナル抗体 (Abcam) を用いて ECLplus(GE Healthcare Japan)にてウェスタンブロットティングを行う。
- (6) 免疫組織蛍光染色:10%FCS を加えた DMEM 培地中で、細胞を 8-chamber 上に播き、2 日間培養後、3.5%パラホルムアルデヒドにて固定。0.2%Triton-X 100 で浸透させた後、Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen) でブロッッキング処理を行う。1 次抗体には抗 NF- $\kappa$ B および c-Met ウサギポリクローナル抗体 (Abcam) を、2 次抗体には Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes) を用い、蛍光顕微鏡観察を行って評価する。

#### 4. 研究成果

- (1) OSCC 臨床サンプルにおける CD44 および NF- $\kappa$ B の免疫組織化学的評価  
高分化型 OSCC では NF- $\kappa$ B は一部の腫瘍細胞の細胞質と核において染色された。NF- $\kappa$ B は腫瘍巣の辺縁細胞は、腫瘍巣の中央よりも濃染色された (図 1)。低分化型 OSCC では腫瘍巣の invasion front で強く染色された (図 2)。さらに、転移巣では CD44 と NF- $\kappa$ B の両方の強い発現が観察された (図 3)。NF- $\kappa$ B の発現は、低分化型 SCC と高分化型 SCC の間に有意差が観察され、さらに N (+) と N (-) 間での違いは有意であった。



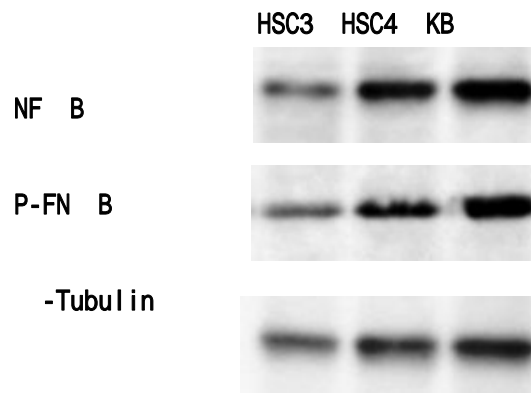
(図 1)

(図 2)

(図 3)

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株における NF- $\kappa$ B の発現

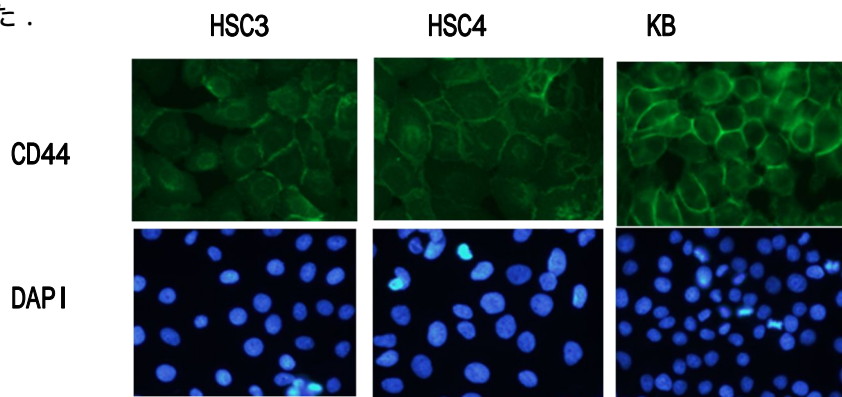
Western blotting では HSC3 , HSC4 そして KB とも NF- $\kappa$ B の発現がみられた . さらにいずれの細胞においてもリン酸化 NF- $\kappa$ B の発現がみられた . 特に KB では NF- $\kappa$ B , そしてリン酸化 NF- $\kappa$ B とも強い発現が確認できた (図 4) .



(図 4)

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における CD44 の細胞内局在

以前われわれは KB は sphere formation を示すことから幹細胞性を持つことを報告した . そこで CD44 の細胞内局在を解析したところ HSC3 and HSC4 では CD44 の発現はわずかであった . しかし , KB においては細胞膜上で CD44 の明らかな発現を認めた (図 5) . CD44 は癌幹細胞マーカーであることが知られている . よって KB は癌幹細胞性を示すことが分かった . 以上の結果は , われわれが以前に報告した結果と一致することを示す . さらにこれらの結果から , OSCC においても NF- $\kappa$ B が CSC に関与することが示唆された .

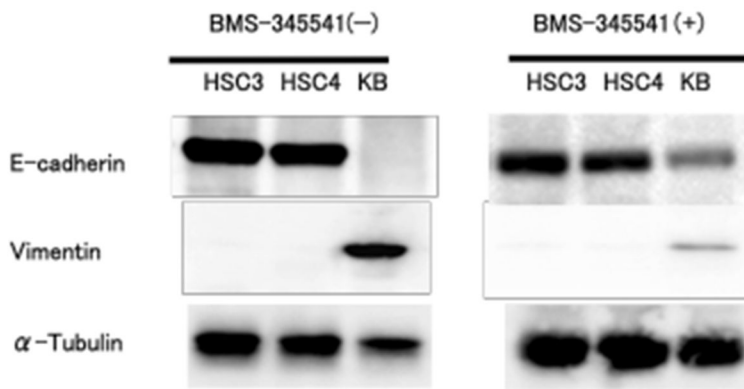


(図 5)

(4) NF- $\kappa$ B 阻害剤 BMS-345541 は EMT に関与する蛋白の発現を低下させる

sphere 形成能を示す KB と EMT との関連を特定するために、我々は上皮細胞と間葉細胞のマーカーを調べた。KB 細胞は、間葉系マーカーであるビメンチンを発現しているが、上皮マーカーである E-カドヘリンを発現していないことがわかり、KB 細胞が間葉系幹様細胞であることを示している。それに比べて、HSC3 と HSC4 は E-カドヘリンの発現を示したがビメンチンの発現は示さなかった (図 6A) これは、HSC3 と HSC4 細胞が上皮性癌細胞であることを示している。

NF- $\kappa$ B の活性化は、EMT 転写因子の発現調節、癌細胞の血管新生や増殖の調節など、癌のいくつかの重要なプロセスに関与している。したがって、口腔 CSC の標的化における NF- $\kappa$ B 阻害剤 BMS-345441 の有効性を、これらのプロセスに関与する遺伝子の発現を低下させる能力によって評価した。KB 細胞において BMS-345441 で 12 時間処理するとビメンチンの発現を抑制した。それに反して上皮マーカーである E-カドヘリンの明らかな発現が確認された。この結果は NF- $\kappa$ B 阻害剤 BMS-345441 により KB 細胞が間葉系幹様細胞から上皮性癌細胞に変化したことが示唆された。一方、HSC3 と HSC4 は E-カドヘリンの発現はほぼ変化なく、そしてビメンチンの発現は示さなかった (図 6B)。これは、HSC3 と HSC4 細胞が上皮性癌細胞の性質を維持していることを示している。

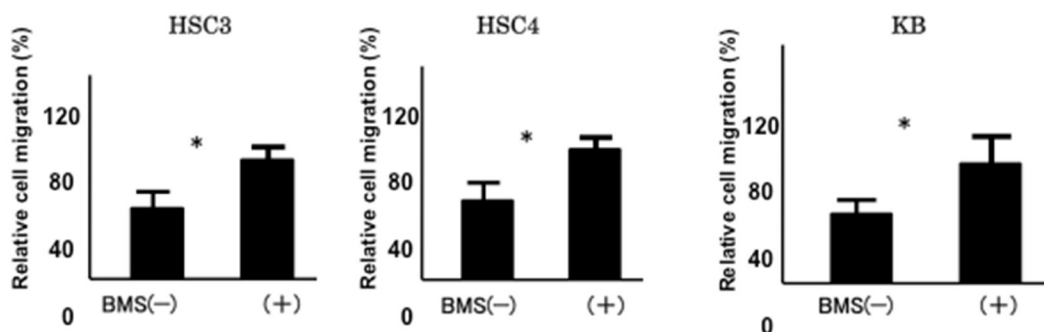


(図 6A)

(図 6B)

(5) NF- $\kappa$ B 阻害剤 BMS-345541 は OSCC の遊走能を阻害する

口腔 CSC および非 CSC の遊走能阻害における BMS-345541 の効果を検討するために migration assay を行った。図 7 は遊走能の割合のグラフを示す。BMS-345441 による処理は HSC3, HSC4 そして KB の全ての遊走を阻害した。これらの結果は BMS-345441 は CSC および非 CSC とともに遊走能を効果的に阻害したことを示す。



(図 7)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nozaki Masami, Yasui Hiroki, Ohnishi Yuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Ligand-Independent EGFR Activation by Anchorage-Stimulated Src Promotes Cancer Cell Proliferation and Cetuximab Resistance via ErbB3 Phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1552 ~ 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11101552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Kazutaka, Ohnishi Yuichi, Fujii Tomoko, Kakudo Kenji, Akane Masaki	4. 巻 31
2. 論文標題 A case of dedifferentiated carcinoma occurring in adenoid cystic carcinoma of the submandibular gland with multiple metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2016.12.009	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 -
1. 著者名 Ohnishi Yuichi, Yasui Hiroki, Nozaki Masami, Nakajima Masahiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Molecularly-targeted therapy for the oral cancer stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 88 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2017.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohnishi Y, Yasui H, Kimura K, Watanabe M, Fujii T, Hamada H, Muroi Y, Motohashi T, Kubo H, Akane M, Tsunokuma M, Nakajima M	4. 巻 52
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor increases the invasive potential oh human oral cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 69-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18905/jodu.52.1_75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Y, Fujii T, Sakamoto T, Watanabe M, Motohashi T, Kubo H, Nakajima M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Malignant mesothelioma metastatic to the oral region and latest topics (Review)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Y, Sakamoto, Zhengguang L, Yasui H, Hamada H, Kubo H, Nakajima M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Curcumin inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral cancer cells via c-Met blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4177-4128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura K, Ohnishi Y, Okamura T, Tominaga K, Nakajima M.	4. 巻 54
2. 論文標題 Effect of HGF/c-Met pathway in oral squamous cell carcinoma on EMT and metastatic potential.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 135-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18905/jodu.54.1_135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 阪本 主, 木村 一貴, 岡村 友玄, 大西 祐一, 富永 和也, 中嶋 正博
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるPD-1, PD-L1, C-Met発現の局在と転移に関する解析
3. 学会等名 第64回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 一貴, 大西 祐一, 岡村 友玄, 富永 和也, 中嶋 正博
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるHGF/c-Met経路がEMTおよび転移能へ及ぼす影響について
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎 正美, 大西祐一
2. 発表標題 c-Met は lamellipodin 発現上昇による lamellipodia 形成促進を介して癌細胞の遊走を制御する.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 祐一, 野崎正美
2. 発表標題 足場刺激性 Src によるリガンド非依存的 EGFR 活性は ErbB 3 リン 酸化を介して癌細胞の増殖を促進する.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 一貴, 阪本 主, 大西 祐一, 赤根 昌樹, 岡村 友玄, 富永 和也, 中嶋 正博
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるHGF/c-Metシグナル伝達経路のEMTおよび転移能への影響について
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 野崎 正美, 大西 祐一
2. 発表標題 Ligand-independent EGFR activity reduces anti-cancer effect of cetuximab via ErbB3 signaling in non-stem cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪本 主, 木村一貴, 岡村友玄, 李 争光, 大西祐一, 富永和也, 中嶋正博
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるPD-L1 とc-Metの発現の関係性について.
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------