

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09904

研究課題名（和文）CD82を標的とした頭頸部癌の後発遠隔転移の克服

研究課題名（英文）Overcoming Late Distant Metastases of Head and Neck Cancer by Targeting CD82

研究代表者

成田 憲彦（NORHIKO, NARITA）

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：80345678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌の後発転移の原因となる血中循環腫瘍細胞クラスターや微小転移の抗腫瘍薬耐性メカニズムを、三次元培養モデル（MCTS）で解析した。この結果頭頸部癌細胞MCTSは抗腫瘍薬や放射線に高い耐性を示し、CD82を高発現していることが示された。CD82をRNAiで抑制するとこれらの耐性が減弱することが解った。CRISPRでCD82ノックアウト株（CD82KO）を作製し、シークエンシングで欠失していることを確認した。CD82KOのMCTSでは抗腫瘍薬耐性能が著明に減弱していることが証明された。このことからCD82を標的とし、頭頸部癌の後発転移を抑制する新たな治療戦略の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行頭頸部癌では集学的治療によって局所制御は良好でも、数年後に遠隔転移を来し予後不良となる例を経験する。この後発遠隔転移の原因として考えられているのが同定困難な血中循環腫瘍細胞や微小転移巣の存在である。これらに対して各国で導入化学療法が検討されてきたが、後発遠隔転移に対する効果は未だ確定されていない。このことから血中循環腫瘍細胞や微小転移巣は抗腫瘍薬耐性を獲得していると考えられる。本研究でCD82抑制により血中循環腫瘍細胞や微小転移巣の抗腫瘍薬耐性が減弱される可能性を明らかにした。このことからCD82を標的分子とし、頭頸部癌の後発遠隔転移を克服する新たな治療戦略の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of chemotherapeutic drug resistance of circulating tumor cell clusters and micro-metastases, which cause late metastasis of head and neck cancer, was analyzed in a three-dimensional culture model (MCTS) of head and neck cancer cells. The results demonstrated that MCTS cells were highly resistant to chemotherapeutic drugs and radiation and expressed high levels of CD82. The suppression of CD82 using RNAi decreased resistance to chemotherapeutic drugs and radiation in MCTS. The MCTS of CD82KO, in which CD82 was knocked out using CRISPR, showed markedly reduced resistance to chemotherapeutic drugs. These results suggest the possibility of targeting CD82 as a novel therapeutic strategy to inhibit late metastasis of head and neck cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 CD82 抗腫瘍薬耐性 血中循環腫瘍細胞 微小転移 三次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行頭頸部癌において、初回治療時に同定できない血中循環腫瘍細胞クラスター(circulating tumor cell cluster, CTC クラスター) や微小転移巣が存在し、後年に遠隔転移となり予後を悪化せしめる可能性がある。これらに対する導入化学療法の効果は現時点では限定的であり、その抗腫瘍薬耐性克服は頭頸部癌の更なる予後改善への新たな治療戦略になると考えられる。

過去に我々は DNA 損傷ストレス誘導型アポトーシスに着目し、PCBP4(Ito, Narita. Sci Rep 2015)や SESN1(Narita, Ito. Int J Hyperthermia 2018)を抑制することで頭頸部癌におけるシスプラチンの効果を増感できることを報告してきた。しかしこれらは単層培養癌細胞で得られたデータであり、無血管領域である CTC クラスター・微小転移巣の抗腫瘍薬耐性メカニズムは異なる可能性がある。そこで本研究では CTC クラスター・微小転移巣に生物学的に類似する三次元培養モデル(MCTS)を用いて新規抗腫瘍薬耐性メカニズムの解明を行った。

2. 研究の目的

MCTS はほぼ細胞間接着のみで生存する癌細胞の凝集塊であり、Cancer stem-like cell とも言われ癌幹細胞と類似した抗腫瘍薬/放射線耐性を示すことが知られる。予備実験としての MTT アッセイでは口腔癌細胞株 T3M-1 の MCTS はシスプラチン、パクリタキセル、放射線に高い耐性を示した。この耐性能の可逆性を検証するために T3M-1 の MCTS からシングルセルを単離し、単層培養に戻した細胞株 T3M-1SMO1 および SMO2 を樹立した。両細胞株で耐性能を解析したところ、抗腫瘍薬/放射線耐性が顕著に減弱することが解った。このことから MCTS の耐性能は可逆性であり、MCTS と同様に CTC クラスター・微小転移巣の抗腫瘍薬耐性も克服できる可能性が示唆された。本研究で MCTS 形成に関わる遺伝子を同定し、これを抑制することで MCTS の抗腫瘍薬耐性メカニズムを明らかにできる可能性が示唆された。頭頸部癌の後発転移を抑制する新たな治療戦略を解析する。

3. 研究の方法

【1】MCTS 形成における遺伝子発現の解析

T3M-1 単層培養と MCTS からそれぞれ RNA を抽出し、PCR アレイ(キアゲン社製 RT2 Profiler PCR Array)を用い CT 法により発現遺伝子の変化を解析する。また PCR アレイの結果から CD82 を候補遺伝子とし、リアルタイム PCR で発現を確認する。

【2】CD82 による耐性化メカニズムの解析

T3M-1 において特異的 siRNA で CD82 の発現が抑制されるかウェスタンブロットで確認する。CD82RNAi により T3M-1 の MCTS 形成能、MCTS のシスプラチンおよびパクリタキセル耐性能が減弱するかを三次元培養 MTT アッセイで明らかにする。

【3】CD82 ノックアウト頭頸部癌細胞株の作製

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を用いて CRISPR/double nickase により CD82 をノックアウトした細胞株 CD82K01 および CD82K02 を作製する。シーケンシングを行い、欠失を確認する。リアルタイム PCR およびウェスタンブロットで実際の CD82 発現がノックアウトされているかを確認する。

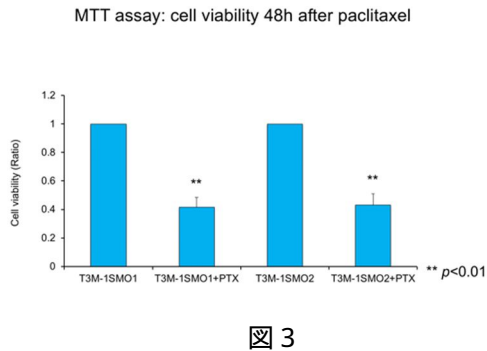
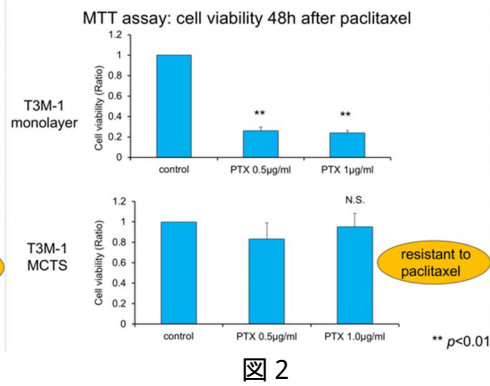
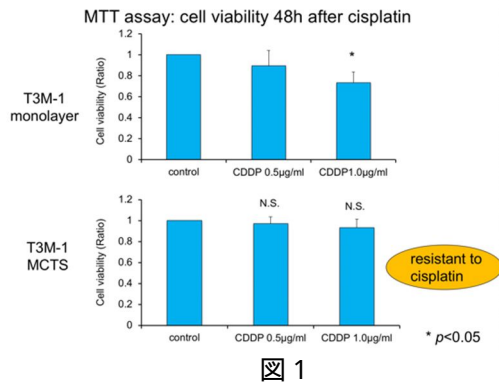
【4】CD82 ノックアウト細胞での MCTS 機能解析

CD82K01 および CD82K02 を三次元培養し、MCTS を形成させる。その形態を顕微鏡で観察し、HSC-3(野生株)の MCTS と形態学的差違があるかを確認する。次に MTT アッセイで野生株、CD82K01、CD82K02 の MCTS のシスプラチン耐性能を解析し、CD82 の抗腫瘍薬耐性機構における役割を解析する。

4. 研究成果

【予備実験】

T3M-1 を三次元培養し MCTS を形成した。MTT アッセイで細胞生存能を解析したところ、MCTS は単層培養 (monolayer) に比べてシスプラチンおよびパクリタキセル耐性を示した (図 1、2)



また MCTS からシングルセルを取り出し、単層培養に戻した細胞株 T3M-1SMO1 および SMO2 はパクリタキセル耐性を失うことが確認された (図 3)。これらの結果から MCTS の耐性能は可逆性であることが示された。

【1】MCTS 形成における遺伝子発現の解析

PCR array results (metastasis-related genes)

Gene	Fold Change
APC	3.0474
BRMS1	2.1326
CD82	3.0452
CXCR2	3.1897
MMP10	6.1592
MMP7	3.1133
MTSS1	2.3886
SYK	2.634

Genes with increased expression in MCTS compared to monolayer.

表 1

T3M-1 単層培養と MCTS で遺伝子発現の変化を PCR アレイで解析した。表 1 に MCTS で 2 倍以上発現が更新している遺伝子を示す。この中で本研究では CD82 に着目した。CD82 は E カドヘリンと カテニンの複合体を安定化し、細胞間接着に深く関与する。しかしながら薬剤耐性への機能は多くが未だ不明である。CD82 の実際の発現が MCTS で増加し、SMO では減少することを確認した (data not shown)。

【2】CD82 による耐性化メカニズムの解析

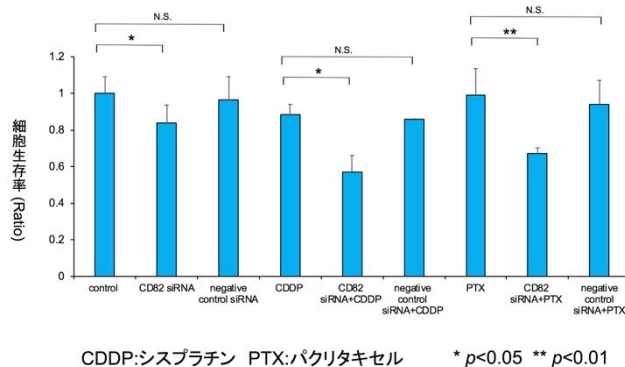


図 4

T3M-1 において RNAi で CD82 が抑制されることをリアルタイム PCR で確認した (data not shown)。

RNAi による CD82 抑制は T3M-1 の MCTS 形成を抑制した。また MCTS のシスプラチン耐性、パクリタキセル耐性を減弱させることが解った (図 4)。

【3】CD82 ノックアウト頭頸部癌細胞株の作製

CRISPR/double nickase プラスミドを HSC-3 にトランスフェクションし、CD82 ノックアウト株 CD82K01 および CD82K02 を樹立した。シーケンシング、ウェスタンブロットで CD82 ノックアウトを確認した (data not shown)。

【4】CD82 ノックアウト細胞での MCTS 機能解析

CD82KNO1 および CD82KNO2 では MCTS のシスプラチン耐性能が著明に減弱することが確認された (data not shown)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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	伊藤 有未 (ITO YUMI) (00646458)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教 (13401)	
研究分担者	高林 哲司 (TAKABAYASHI TETSUJI) (70397272)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師 (13401)	

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