

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18775

研究課題名(和文) 頭頸部癌における癌幹細胞マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of cancer stem cell markers in head and neck cancer

研究代表者

近藤 俊輔 (Kondo, Shunsuke)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90596363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌の分野ではまだ十分な癌幹細胞研究の進展は見られておらず、治療に繋がる頸部癌幹細胞をターゲットにした特異的分子は同定されていない。頭頸部癌において特に予後不良な下咽頭癌患者を対象に癌組織切片を用いてCD44、ALDH1およびPDL1の免疫染色を行ない陽性細胞数を測定・数値化し、予後との関連を評価した。CD44は予後との関連を認め、ALDH1およびPDL1に関しては予後との明らかな関連は認めなかった。今後CD44陽性細胞に絞り、更に癌幹細胞器質を持った集団を同定することで下咽頭癌に対する特異的なマーカーを探索することが必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔咽頭癌の5年生存率は60%前後である。加療後に完全奏功の評価となった症例においても再発が多く見られる。このような再発や転移の要因として注目されているのが癌幹細胞である。今回の研究により、まずは下咽頭癌における癌幹細胞マーカーを同定していくことで、不良な転移となる約4割の癌患者の既存の治療に代わる新たな治療の開発の一助となったと考える。しかし、いまだに癌幹細胞器質をもつ細胞集団を完全に同定することは困難であり、引き続き研究を継続することでより特異性の高いマーカーを同定していくことが必要となる。

研究成果の概要(英文)：Sufficient progress in cancer stem cell research has not yet been made in the field of head and neck cancer, and no specific molecule targeting cancer stem cells that leads to treatment has been identified. For patients with hypopharyngeal cancer, immunostaining of CD44, ALDH1 and PDL1 was performed using cancer tissue sections, and the number of positive cells was measured and quantified to evaluate the relationship with prognosis. CD44 was associated with prognosis, but ALDH1 and PDL1 were not clearly associated with prognosis. In the future, it will be necessary to search for specific markers for hypopharyngeal cancer by narrowing down to CD44-positive cells and identifying populations with cancer stem cell organs.

研究分野：頭頸部癌

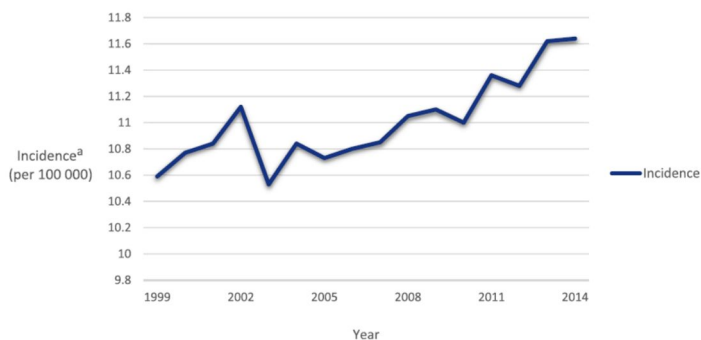
キーワード：頭頸部癌 下咽頭癌 癌幹細胞 CD44

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔咽頭癌の罹患率は HPV 関連癌の増加に伴い、年々増加傾向にある。(Howlader NNA, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2014. 2017. 表1)

分子標的薬や免疫チェックポイント薬を中心とした新規の薬物療法の開発に伴い、予後の改善が期待されるが、いまだに口腔咽頭癌の5年生存率は60%前後である。(SEER cancer statistics: oral cavity and



pharynx cancer. 2017.) 治療

抵抗性を示す症例や加療後にCRの

表1

評価をされた後に再発や頸部リンパ節転移を来す症例が臨床でも多く見られる。このような治療抵抗性や再発・転移の要因として昨今注目されているのが癌幹細胞である。初回治療において癌幹細胞が治療抵抗性を示し、残存している癌幹細胞が再発や転移を起こす要因として考えられている。(Tannishtha R, Sean J.M, et al. Nature, 2001.) 急性骨髄性白血病は最初に癌幹細胞が同定された疾患であり、もっとも癌幹細胞研究が進展している。急性骨髄性白血病では、既に白血病幹細胞に特異的に発現する表面抗原分子 (TIM-3) が同定され、その分子をターゲットにした治療が動物実験レベルで効果を示していることも報告されている。(Kikushige Y, et al. Cell Stem Cell. 2010.) 頭頸部癌ではPrinceらによってCD44陽性かつCD24陰性が癌幹細胞のマーカー候補となることを最初に報告した。(M. E. Prince, et al. Proc. Natl. Acad. Sci, 2007.) さらにChenらは動物実験においてCD44陽性、CD24陰性かつAldehyde

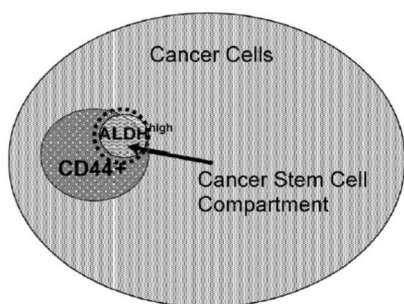


図1

dehydrogenase 1 (ALDH1) 陽性の頭頸部癌細胞はマウスにて生着増殖を認めたと、ALDH1陰性の癌細胞は生着増殖を認めず、ALDH1陽性も頭頸部癌幹細胞のマーカーとなることを報告した。(Yi-Wei Chen, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009.) (図1) またNasmanらは Human papilloma virus (HPV) 関連中咽頭癌において特にCD44の発現が弱い例では予後が極めて良好であることを報告している。(Anders Nasman1, et al.

Cancer Medicine, 2013.) 癌幹細胞の性質を持つ細胞の割合が少ないと予後が良好であるとの結果であり、癌幹細胞をターゲットにした治療により癌幹細胞の割合を減らすことができれば予後改善に寄与できる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

現時点では頭頸部癌の分野ではまだ十分な癌幹細胞研究の進展は見られておらず、頸部癌幹細胞に特異的分子は同定されていない。背景で述べたCD44やALDH1以外にも、CD10、CD29、CD133等頭頸部癌幹細胞のマーカーは多数報告(Paul Ambrose Reid, et al. Head Neck. 2017) されているが、いずれが最も頭頸部癌幹細胞のマーカーとして適しているかも明らかではない。その為、我々は頭頸部癌幹細胞に発現するマーカー、特異的分子を同定し、将来的に癌幹細胞を

ターゲットにした治療の開発へ繋がることを目的とし本研究を立案し施行した。

3. 研究の方法

(1) 後ろ向き研究

頭頸部癌において現時点で癌幹細胞のマーカーとして報告されている、CD44 陽性かつ ALDH1 陽性細胞の癌細胞に占める割合を下咽頭癌組織で検討する。さらに予後との関連を解析し、CD44+/ALDH1+細胞が癌幹細胞の能力を有し、全癌細胞中を占める割合が高いと治療抵抗性や再発・転移を来しやすいのかを検討する。

-過去の手術や生検にて採取されている下咽頭癌患者の FFPE サンプルブロックを材料に（放射線療法や化学療法を施行前に採取された検体）HNSCC の癌幹細胞のマーカーとなっている CD44 と ALDH1 および他の候補として PDL1 の免疫染色を行う。

具体的な実験計画

- ・ FFPE ブロックを 4 um の厚さの切片に切断しスライドガラス作成
- ・ 癌の局在の確認の為に HE 染色
- ・ CD44、ALDH1、PDL1 の免疫染色
- ・ 蛍光顕微鏡を使い、CD44、ALDH1 および PDL1 が発現している細胞数をカウント（高倍率(200倍)でがん組織の10箇所撮影し、各場所毎に、腫瘍細胞200細胞あたり、CD44+/ALDH1+の細胞数をカウント。最後に10箇所のカウント数で平均化した結果を解析に使用。）
- ・ 下咽頭癌細胞中の CD44、ALDH1 および PDL1 の割合を数値化するとともに、予後との関連を統計学的に検討する。

(2) 前向き研究

前向きに手術で採取した検体から細胞を集め、CD44 + /ALDH1+細胞集団を集め、さらにスフィア形成法・Slide population法を用い幹細胞の特徴を持った細胞集団を分離する。つづいて、NOD-SCID/^{cnll} マウス（白血球幹細胞のスクリーニングで用いられる、T細胞、B細胞、NK細胞がない免疫不全マウス）に移植し、腫瘍増殖性が見られる細胞群を絞りこむ。最後に、この細胞群を次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析をし、幹細胞性の高い新しい因子（新規頭頸部癌幹細胞マーカー）を同定する。さらに、培養条件下で新規頭頸部癌幹細胞マーカー遺伝子を siRNA で knock down したときにスフィア形成法にて癌幹細胞の特性が失われることを確認する。

更にこの新規頭頸部癌幹細胞マーカーの抗体を使って、後ろ向きに HPC の組織切片で免疫染色を行い、新規頭頸部癌幹細胞マーカー発現の割合ごとに生存曲線を描いて、このマーカーの有用性についても検討する。

具体的な実験計画

- ・ 下咽頭癌患者の手術にて摘出された検体を 5 mm x 5 mm x 5mm の大きさで採取し、collagenase type VIII (1.5 mg/ml, Sigma, Munich, Germany) と DNase type I (1.0 ìg/ml) の入った培地(RPMI)で37 インキュベーター内で120分間優しく攪拌し、細胞を分離。
- ・ 分離させた癌細胞を flow cytometry にかけて CD44+/ALDH1+の集団を回収。
- この細胞集団をスフィア形成法と Slide population 細胞法を用い、より幹細胞性の高い集団に分離。

- ・スフィア形成法：接着細胞を浮遊状態で培養すると、幹細胞が細胞塊（スフィア）を形成することから、スフィアを回収することで幹細胞性の細胞集団を集積することが可能。

- ・slide population 法：細胞に DNA 蛍光色素である Hoechst 33342 色素を取り込ませて紫外線レーザーを照射すると多数の細胞は強い蛍光を発するのに対して、ABC トランスポーターによって色素を排泄した細胞は弱い蛍光しか発しないことを利用する方法。幹細胞では、ABC トランスポーターが発現していることから、蛍光を発しない。

- ・8週齢の NOD-SCID/^{cnll} マウス(白血病幹細胞のスクリーニングで用いられる、T細胞、B細胞、NK細胞がない免疫不全マウス)に 10⁶細胞数を移植し、飼育し、腫瘍形成増殖を確認。

- ・マウス実験で、腫瘍が形成された細胞群を、次世代シーケンサーでトランスクリプトーム解析を行い、新規頭頸部癌幹細胞のマーカー遺伝子を絞り込む。

- ・siRNA 法を使って、新規頭頸部がん幹細胞マーカーの評価。評価方法は、スフィア形成法で癌幹細胞性の評価を行う。培養条件下で、患者由来の癌幹細胞を用い新規頭頸部癌幹細胞マーカー候補遺伝子を knock down し、スフィア形成が失われれば幹細胞性が失われたことが実証される。

- ・新規頭頸部癌幹細胞マーカー候補の分子の抗体を使って、再度実験 1 で行った過去の検体での免疫染色を新規マーカー候補の抗体で行う。免疫染色での発現強度と臨床での予後との相関を検討し、有力なマーカー候補となることを証明する。

4. 研究成果

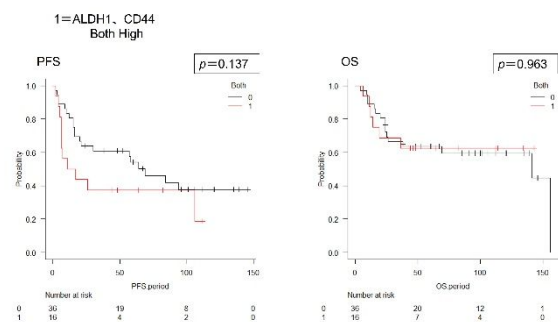
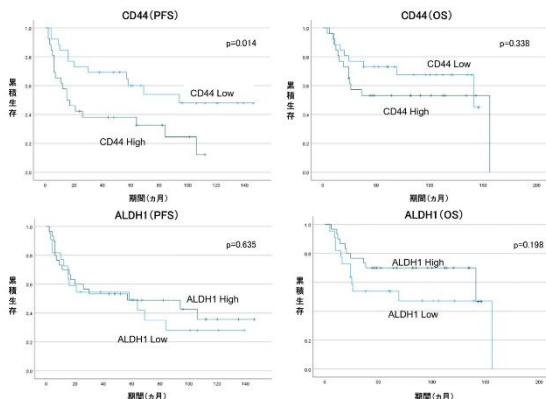
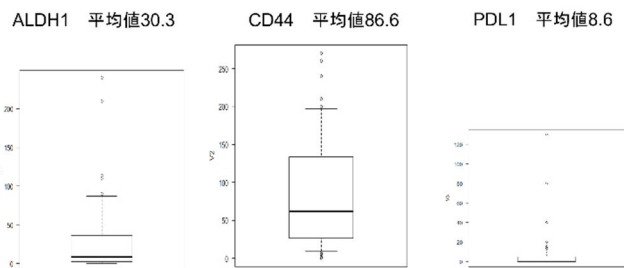
(1) 後ろ向き研究

下咽頭癌 55 例を対象とし CD44, ALDH1 および PDL1 の免疫染色を行った。免疫染色の評価としては IHC score を使用した。(IHC score = percentages of positive cells (3 視野で測定) × staining intensity score (none (0), weak (1), intermediate (2), strong (3)) range of 0-300)

まず各分子での IHC score に関しては、CD44 の発現が最も高く、PDL1 に関しては非常に低発現であった(右図)。

次に各分子の予後との関連であるが、各分子を高発現の群および中・低発現の群に群分けし、予後との関連を評価

した(下図)。CD44 は予後との関連を認めしたが、ALDH1 および PDL1 に関しては予後との関連は認められなかった。また CD44 および ALDH1 がともに高発現の群と残りの症例でも比較検討を行ったが予後に関して有意な差は認めなかった。



本検討の後に下咽頭癌症例を追加し再度の解析を行っているが、ここまでの検討にて CD44 は下咽頭癌に対しての癌幹細胞のマーカーとしての候補となりうることが予測されたが、ALDH1 に関しては他の報告と異なる結果となった。

(2) 前向き研究

当初の予定では CD44, ALDH1 両方が強発現の細胞群を回収予定であったが、後ろ向き研究から CD44 強発現の細胞群回収に変更をした。下咽頭癌患者の手術にて摘出された検体を 5 mm x 5 mm x 5mm の大きさで採取し、collagenase type VIII (1.5 mg/ml, Sigma, Munich, Germany) と DNase type I (1.0 μ g/ml) の入った培地 (RPMI) で 37 インキュベーター内で 120 分間優しく攪拌し、細胞を分離。分離させた癌細胞を flow cytometry にかけて CD44+ の集団を回収。この細胞集団をスフィア形成法と Slide population 細胞法を用い、より幹細胞性の高い集団に分離。現時点では集団の分離まで行い、マウスでの増殖評価を検討している段階である。集団の分離までは確認作業および培養まで可能としており、引き続き研究を継続している。

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
研究協力者	池上 太郎 (Ikegami Taro)		

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