

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390517

研究課題名（和文） 口腔がん幹細胞の分離と幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文） Isolation of oral cancer stem cells and development of new therapies targeted cancer stem cells.

研究代表者

白砂 兼光（SHIRASUNA KANEMITSU）

広島大学・医歯薬学総合研究科・特任教授

研究者番号：30093420

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高転移性腺様嚢胞癌細胞株(ACCS-M GFP)を樹立し、低転移性親株(ACCS GFP)と比較を行うことにより、転移関連分子の同定及び転移機構の解析を行った。ACCS-M GFP は、高い造腫瘍性や上皮間葉移行（EMT）性状、スフェア形成能亢進、幹細胞マーカー発現より、癌幹細胞様細胞であることが示唆された。EMT および幹細胞形質中心的因子を探るため、Brachyury を shRNA によりノックダウンした結果、全ての EMT 関連、未分化マーカーの発現低下、EMT 形質およびスフェア形成能が消失した。以上より、腺様嚢胞癌の転移機構に癌幹細胞、EMT 関与が重要な役割を担っており、その中心的制御因子として Brachyury の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the mechanisms of adenoid cystic carcinoma (AdCC) metastasis, we established green fluorescence protein (GFP) –transfected parental ACCS-GFP and high metastatic ACCS-M GFP. ACCS-M GFP displayed sphere-forming ability and high expression of epithelial–mesenchymal transition (EMT)-related genes, stem cell and differentiation markers. Transfection with short hairpin RNA (shRNA) silencing of the T-box transcription factor Brachyury (also a differentiation marker) resulted in downregulation of the EMT and stem cell markers. In addition, sphere-forming ability and EMT characteristics were simultaneously lost.

We conclude that the EMT is directly linked to CSC and that Brachyury is a central regulator of EMT and CSC. These results suggest that Brachyury will be a potential therapeutic target for anti-CSC therapy for AdCC in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんは手術技術や再建技術の向上から局所制御率は飛躍的に改善している一方で、転移症例における制御不能例が治療成績を低下させている。

浸潤・転移を抑制する為には、外科的治療と共に、転移分子を標的とした分子標的療法が必須である。他領域でおこなわれている分子標的療法は効果は必ずしも良好とはいえない。例えば分子標的療法として広く用いられているイレッサなどのEGF受容体阻害剤は、増殖、浸潤を促進するシグナルを抑制しようとするもので、EGF受容体強陽性の限られた症例に効果があるが一方で非常に重篤な副作用を伴うことが問題となっている。合成メタロプロテアーゼ阻害剤は欧米ではすでに臨床応用されたがその効果は期待に反したものであった。この原因として癌の浸潤転移が多くの転移分子に制御を受けており、単純な単一分子を標的にした治療では浸潤転移機構を制御できないからであると考えられる。

さらに、近年癌細胞にもその根源となりうる幹細胞の存在が報告されるようになった。分子標的治療や化学療法においてこの幹細胞が残存すると、これが転移をきたす原因となる。さらに幹細胞はABC transpoter familyである多剤耐性遺伝子MDR-1による薬剤排出機能を有するため多くの抗がん剤に対して耐性を有することが知られている。すなわちがん幹細胞を根絶させることががん治療を有効に進める鍵であり、このためには従来の薬剤による分子標的治療では不可能である。口腔癌においてはこの幹細胞の分離はされておらず、さらなる治療成績の向上には幹細胞の分離と分子標的となりうる分子の解析が必須である。すなわち、これからの分子標的治療はがん幹細胞を標的にした転移制御療法として考えていくべきと考える。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究は

- (1) 口腔がん幹細胞を分離する。
- (2) 幹細胞について特に口腔癌の浸潤・転移における関連分子を分子標的として検索することにより、
  - ①口腔癌幹細胞に特化した、
  - ②副作用の少ない、
  - ③複数の転移分子の同時制御、による転移抑制療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) In vivo selectionによるがん幹細胞リッチな細胞群の分離

腺様嚢胞癌細胞株ACCSにGFP遺伝子を導入し、ヌードマウスに接種した。ACCSはマウスにおける造腫瘍性はないが、接種条件を調整することによって形成された腫瘍からGFP発光を元に分離した細胞をACCS-T GFPとした。ACCS-T GFPを繰り返しマウス舌に接種することによりマウス顎下腺に転移をきたした。つぎに転移巣より同様に細胞を分離し、舌に接種を繰り返した(in vivo selection)。その結果100%の個体にリンパ節転移をきたすACCS-M GFPを樹立した。

- (2) がん幹細胞を用いた自然転移モデルの作成

GFPを導入した細胞株は原発巣、転移巣ともに励起光により発光することから微小な転移巣も検出が可能である。このような特異度と感度の高いモデルを作成した。

- (3) 幹細胞の遺伝子プロファイルのマイクロアレイによる解析

次に(1)で樹立した細胞を親株であるACCSとマイクロアレイを用いて比較した。

- (4) 遺伝子ノックダウン法

マイクロアレイで有意であった遺伝子についてshort hairpin RNA(shRNA)による遺伝子ノックダウンを行った。

- (5) In vitro 浸潤モデルにおける転移抑制の検討

ノックダウンした細胞について、その浸潤能をin vitroにおいて比較した。

- (6) 自然転移in vivoモデルにおける転移抑制の検討

(2)で作成した転移モデルを用いてノックダウンによる転移抑制の効果を検証した。

## 4. 研究成果

- (1) 高転移腺様嚢胞癌細胞株(ACCS-M GFP)における原発巣からの癌細胞離脱促進と、細胞遊走能亢進

まず癌原発巣からの腫瘍細胞の離脱・浸潤能をin vitroで評価するため、in vitro原発巣離脱モデルを用いて検討した。ACCS GFPでは密に細胞凝集しており、凝集塊の周囲辺縁は境界明瞭なリング状を呈していたのに対し、ACCS-M GFPでは、凝集塊から多くの細胞が離脱し、移動しているのが観察できた。この結果から、ACCS-M GFP細胞では細胞間接着が抑制されており、同時に細胞遊走能が亢進していると考えられた。そこで次に、細胞外基質上での細胞遊走能について検討した。ACCS-M GFPはACCS GFPと比較して、I型コ

ラーゲンでは7倍、IV型コラーゲンでは3.5倍とどちらの条件下においても著明な運動の亢進が観察された。以上より、ACCS-M GFP細胞では、細胞間接着が低下し、さらに、周囲細胞外基質との接着性を変化させることによって遊走能が亢進していると考えられた。このことは、ACCS細胞株が高い浸潤転移能を獲得する際に、細胞接着因子の発現変化が関与している可能性を示唆している。

### (2) ACCS-M GFP における E-カドヘリン、インテグリンの発現の変化

この結果より、細胞間接着因子として E-カドヘリン、細胞外基質との接着因子としてインテグリン群の発現変化が考えられた。そこで、これらの細胞接着分子発現変化をタンパクレベルで確認するため、ウェスタンブロッティングにより解析を行った。E-カドヘリンの発現は、ACCS GFP と比較して ACCS-M GFP で著明に低下していた。またインテグリンにおいては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ 、そして  $\beta 1$  の発現が著明に低下していた。一方、インテグリン  $\alpha 5$  は、ACCS GFP、ACCS-M GFP 共に安定的に発現が認められた。

さらに、マイクロアレイでも未分化マーカーの発現亢進、E-カドヘリンの発現低下が著明に認められた。

### (3) ACCS-M GFP における上皮間葉移行 (EMT) 関連マーカーの発現の変化

癌細胞における E-カドヘリンやインテグリンの喪失は、上皮間葉移行 (以下、EMT) の結果であることが報告されている。そこで、間葉系細胞マーカーであるビメンチンをウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、ビメンチンは ACCS GFP に比べ、ACCS-M GFP において強い発現が認められた。また、EMT の状況下では E-カドヘリンの裏打ちタンパクである  $\beta$ -カテニンが細胞膜から細胞質、もしくは核に移行することが報告されている。そこで、細胞を細胞膜分画および細胞質分画に分画分取し、ウェスタンブロッティングを行ったところ、ACCS-M GFP において  $\beta$ -カテニンの細胞膜から細胞質へのシフトが認められた。

これらの結果から、ACCS細胞株の転移機構に EMT が制御する細胞接着因子の発現変化が関与していると考えられた。

### (4) ACCS-M GFP における癌幹細胞様特性についての検討

上皮間葉移行が本腫瘍の造腫瘍性や転移に重要な役割を担っていることが確認され

たが、そのメカニズムについては明らかになっていないことが多い。近年、Weinberg らのグループが乳癌細胞株に EMT をおこすことで癌幹細胞様の形質を獲得することが報告してから、同様の報告や EMT と癌幹細胞との関連を示した報告が増加している。そこで、EMT を起こした ACCS-M GFP が癌幹細胞様の性格を有するか否か、まず自己複製能の指標として sphere forming assay により検討した。このアッセイでは、第1回目のスフェア (1<sup>st</sup> sphere) を分取して、さらにもう一度スフェアを形成させる (2<sup>nd</sup> sphere) ため、スフェア形成能をもつ細胞が 2<sup>nd</sup> sphere で凝縮される。また、このように継代が可能なことが自己複製能の証明となる。ACCS-M GFP は ACCS GFP と比較して、1<sup>st</sup> sphere では、スフェア形成数、スフェアの大きさに共に 2倍程度亢進しており、有意差を認めた。2<sup>nd</sup> sphere では、スフェア形成数において、その差がさらに広がった (図 1)。

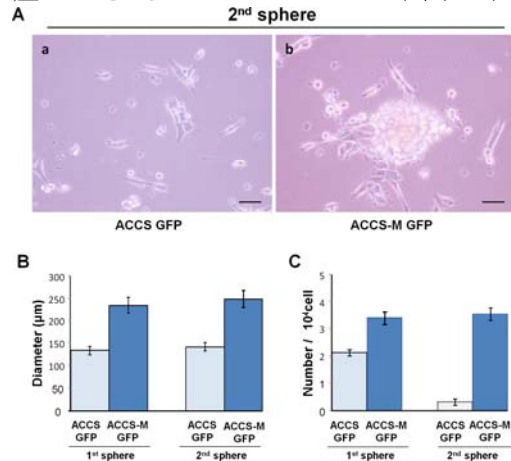


図 1  
ACCS-MGF におけるスフェア形成能の獲得

この結果より、ACCS-M GFP は ACCS GFP と比べて自己複製能を示す細胞を豊富に含むことが示唆された。

### (5) ACCS-M GFP における各種幹細胞マーカーの mRNA レベルの検討

次に、リアルタイム PCR を用いて可能性のある癌幹細胞マーカーとして EMT 関連の遺伝子 (Snail, Twist1, Twist2, Slug, Zeb1, Zeb2, GSK3 $\beta$ , TGF $\beta$ 2) と、胚性幹細胞マーカー (Nodal, Lefty2, Oct4, Pax6, Rex1, Nanog)、胚葉系分化マーカー (Sox2, Brachyury, AFP) の mRNA レベルの発現について定量的検討を行った。ACCS GFP と比較して ACCS-M GFP において、図に示す全ての EMT 関連転写因子で発現増強がみとめられた。特に、slug、Zeb1、Zeb2 では ACCS

GFP の約 4~9 倍の発現量であった。また、Nodal、Pax6、Rex1、Lefty ( 胚性幹細胞マーカー )、Brachyury、Sox2、AFP ( 胚葉系分化マーカー ) でいずれも親株である ACCS GFP の 2~3 倍の発現を示した。幹細胞マーカーのうち Oct-4、Nanog では、両者に有意な差は認められなかった。これらの結果より、EMT 関連遺伝子と未分化幹細胞マーカーは並行して発現亢進しており、EMT を起こした ACCS-M GFP が、未分化な癌幹細胞様の性格を有していることが示唆された。

#### (6) Brachyury の発現抑制による EMT、癌幹細胞様特性の制御

前項で示したマーカー遺伝子の多くは転写因子であり、EMT や癌幹細胞といった現象はこれらの転写因子によって転写された多くの因子によって引き起こされた表現形と考えることができる。では、癌幹細胞様細胞において、幹細胞の特性を制御している大元は何であるかが疑問となる。さらに、この遺伝子をコントロールすることによって EMT と癌幹細胞が同時に制御できれば EMT と癌幹細胞との直接の関連を証明することになる。近年ヒト腫瘍細胞を用いた実験で Brachyury を導入した癌細胞が EMT の形質を示したことが報告された。Brachyury は ACCS-M GFP において親株の約 2 倍に発現亢進していた、そこで胚葉系分化マーカーの Brachyury を short hairpin RNA (sh RNA) 導入によりノックダウンすることで、幹細胞マーカーがどのように変化し、EMT 形質および癌幹細胞形質が変化するか否かについて検討した。

Brachyury shRNA 導入によって、Brachyury の発現は親株 ACCS GFP の発現レベルの約半分に減弱していた。これに伴って、EMT 関連転写因子すべてで発現の抑制がみられた他、ACCS-M GFP で高発現していた未分化幹細胞マーカー (Nodal、Pax6、Rex1、Lefty、Sox2、AFP) についても同様に発現の有意な低下がみられた。次に、EMT 様形質についてウエスタンブロッティングにより EMT 関連蛋白質の発現を検討した。ACCS-M GFP で著明に低下していた上皮系マーカーである E-カドヘリンは、Brachyury shRNA 導入 ACCS-M GFP においてその発現が回復し、発現亢進していた間葉系マーカーのビメンチンは発現が減弱、 $\beta$ -カテニンにおいても ACCS GFP と同様な発現を示した ( 図 2 )。

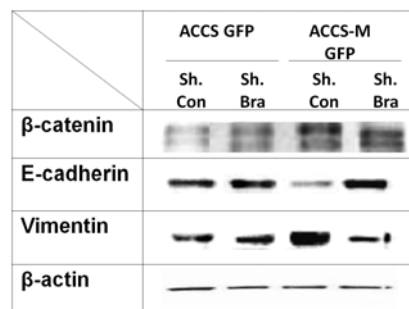


図 2 shRNA Brachyury を導入した ACCS-M GFP 細胞での上皮系特性の回復

さらに sphere forming assay でも、Brachyury shRNA 導入 ACCS-M GFP では、幹細胞様特性が失われ、sphere 形成能が著明に低下していた ( 図 3 )。

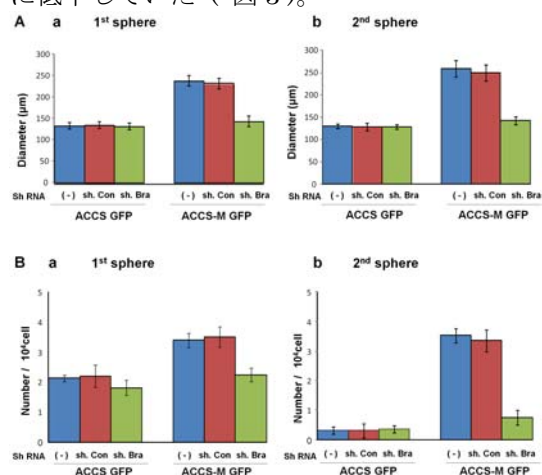


図 3 Brachyury ノックダウンによる ACCS-M GFP のスフェア形成能の抑制

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Ishii K, Shimoda M, Sugiura T, Seki K, Takahashi M, Abe M, Matsuki R, Inoue Y, Shirasuna K: Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. *Int J Oncol* 2011, 38:921-931. 査読有り
- ② 杉浦剛: 腺様嚢胞癌の浸潤・転移機構—上皮間葉移行とがん幹細胞様細胞の関与—. 口腔組織培養学会雑誌 2010, 19:29-35. 査読有り
- ③ Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, Shirasuna K: VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in

oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 2009, 34:673-680. 査読有り

- ④ Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K: A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett* 2008, 266:163-170. 査読有り

〔学会発表〕(計 21件)

- ① 杉浦剛、下田みゆき、石井広太郎、千北さとみ、白砂兼光 腺様嚢胞癌 (AdCC) の上皮間葉移行 (EMT) は癌幹細胞様細胞により制御される—癌幹細胞様細胞における T-Box family 転写因子 Brachyury の重要性— 第 47 回日本口腔組織培養学会 平成 22 年 11 月 13 日高知
- ② 千北さとみ、杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光 The role of CD82/KAI-1 in E-cadherin-mediated adhesion of cancer cells 第 69 回日本癌学会学術総会 平成 22 年 9 月 22 日大阪
- ③ 丹羽崇、上松隆司、高橋美穂、中澤高志、杉浦剛、古澤清文 Tetraspanin regulates cell migration and DPPIV gene family expression. 第 69 回日本癌学会学術総会 平成 22 年 9 月 22 日大阪
- ④ 下田みゆき、杉浦剛、石井広太郎、千北さとみ、小林洋輔、白砂兼光 Cancer stemness regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in oral adenoid cystic carcinoma cells (AdCC). 第 69 回日本癌学会学術総会 平成 22 年 9 月 22 日大阪
- ⑤ 下田みゆき、杉浦剛、石井広太郎、千北さとみ、小林洋輔、白砂兼光 腺様嚢胞癌の転移過程における上皮間葉移行に癌幹細胞様細胞が関与する 第 64 回日本口腔科学会学術集会 平成 22 年 6 月 24 日札幌
- ⑥ 千北さとみ、杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光 CD82/KAI-1 による E-cadherin を介した癌細胞間接着の制御機構 第 64 回日本口腔科学会学術集会 平成 22 年 6 月 24 日札幌
- ⑦ 丹羽崇、上松隆司、高橋美穂、中澤高志、杉浦剛、古澤清文 CD82/KAI-1 発現癌細胞における DPP4 gene family の変動

第 64 回日本口腔科学会学術集会 平成 22 年 6 月 24 日札幌

- ⑧ 杉浦剛、下田みゆき、石井広太郎、千北さとみ、白砂兼光 腺様嚢胞癌の転移における上皮間葉移行に癌幹細胞様細胞が関与する 第 46 回日本口腔組織培養学会 平成 21 年 12 月 5 日東京
- ⑨ 千北さとみ、杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光 The role of CD82/KAI-1 in sialyl Lewis antigen-mediated adhesion of cancer cells 第 68 回日本癌学会学術総会 平成 21 年 10 月 3 日横浜
- ⑩ 下田みゆき、杉浦剛、石井広太郎、千北さとみ、白砂兼光 Involvement of epithelial-mesenchyme transition in metastasis of adenoid cystic carcinoma in a mouse metastasis model. 第 68 回日本癌学会学術総会 平成 21 年 10 月 3 日横浜
- ⑪ 高橋美穂、上松隆司、丹羽崇、杉浦剛、山岡稔、古澤清文 Alteration in the expression of dipeptidyl peptidases in Tetraspanin-expressed cancer cells 第 68 回日本癌学会学術総会 平成 21 年 10 月 3 日横浜
- ⑫ 千北さとみ、杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、石井広太郎、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光 シアリルルイス A, X を介した癌細胞の血管内皮細胞への接着に対する CD82/KAI-1 の影響 第 63 回日本口腔科学会学術集会 平成 21 年 4 月 16 日浜松
- ⑬ 下田みゆき、杉浦剛、石井広太郎、阿部正和、千北さとみ、小林洋輔、白砂兼光 腺様嚢胞癌の転移における上皮間葉移行の関与 第 63 回日本口腔科学会学術集会 平成 21 年 4 月 16 日浜松
- ⑭ 丹羽崇、上松隆司、高橋美穂、杉浦剛、白砂兼光、古澤清文 癌細胞における DPP4 遺伝子ファミリーの発現 第 63 回日本口腔科学会学術集会 平成 21 年 4 月 16 日浜松
- ⑮ 杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、千北さとみ、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光 CD82/KAI-1 によるシアリルルイス抗原を介した癌細胞接着の制御—癌細胞の血管壁接着阻害による転移抑制— 第 45 回日本口腔組織培養学会 平成 20 年 11 月 15 日松本市
- ⑯ M.Takahashi, T. Uematsu, T.Niwa, T.Sugiura, K.Shirasuna, K.Furusawa Phenotypical change in the

tetraspanin CD82/KAI-1 expressed cancer cells 第67回日本癌学会学術総会  
平成20年10月29日名古屋

- ⑰ M. Abe, T. Sugiura, M. Takahashi, M. Shimoda, S. Chigita, K. Shirasuna  
FUNCTION OF CD82/KAI-1 ON SIALYL LEWIS ANTIGEN MEDIATED ADHESION OF CANCER CELLS. 第67回日本癌学会学術総会 平成20年10月28日名古屋
- ⑱ 丹羽崇、上松隆司、高橋美穂、杉浦剛、白砂兼光、古澤清文 癌細胞における Tetraspanin KAI-1/CD82 の発現と形質変化 第53回日本口腔外科学会総会 平成20年10月20日徳島
- ⑲ T. Sugiura, M. Abe, M. Shimoda, S. Chigita, K. Shirasuna FUNCTION OF CD82/KAI-1 ON SIALYL LEWIS ANTIGEN MEDIATED ADHESION OF CANCER CELLS. UICC World Cancer Congress2008 平成20年8月27日 Geneva, Switzerland
- ㉑ 阿部正和、杉浦剛、高橋美穂、石井広太郎、下田みゆき、白砂兼光 癌細胞の細胞間接着における CD82/KAI-1 の機能解析 第62回日本口腔科学会学術集会 平成20年4月18日 福岡
- ㉒ 高橋美穂、上松隆司、杉浦剛、白砂兼光、古澤清文 癌細胞における Tetraspanin KAI-1/CD82 の発現と形質変化 第62回日本口腔科学会学術集会 平成20年4月18日 福岡

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白砂 兼光 ( SHIRASUNA KANEMITSU )  
広島大学・医歯薬学総合研究科・特任教授  
研究者番号：30093420

### (2) 研究分担者

杉浦 剛 (SUGIURA TSUYOSHI)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：40322292

碓 竜也 (IKARI TATSUYA)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：70380467

### (3) 連携研究者

なし