

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10175

研究課題名(和文) がん幹細胞血管ニッチを標的とした口腔がん治療への応用

研究課題名(英文) Targeting the Cancer Stem Cell in Vascular Niche for Oral Cancer Therapy

研究代表者

佐藤 千晴 (Sato, Chiharu)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50222013

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)：がん幹細胞を腫瘍血管内皮細胞と共培養したがん細胞にて、がん幹細胞マーカーの発現が亢進した。またそれらの細胞は抗がん剤に対する薬剤耐性を示した。腫瘍血管内皮細胞において発現が高い分子の発現を抑制したところ、共培養したがん幹細胞における幹細胞マーカーの発現が低下した。また抗がん剤に対する薬剤抵抗性が減弱した。腫瘍組織において、腫瘍血管の近傍でがん幹細胞マーカー陽性細胞が観察された。腫瘍血管の中でも、腫瘍血管内皮細胞マーカーを高発現している血管の近傍に癌幹細胞が局在している傾向がみられた。今後、それらの発現と臨床病理学的因子、予後との関連などを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの難治性に起因するがん幹細胞に関する研究は、現在広く行われている。しかし、腫瘍血管に着目したがん幹細胞研究はほとんど報告がない。がん細胞およびがん幹細胞だけを標的としても、それを養う腫瘍血管が残っていれば、がん幹細胞をサポートし、わずかに残ったがん幹細胞が増殖してがんの再発や転移につながる。がんを根治するためには、がん細胞、がん幹細胞のみならず、腫瘍血管も標的とする必要があり、また本研究は口腔がんのみならず、多くのがんに共通したがん幹細胞標的化戦略に有用であることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells co-cultured with tumor endothelial cells showed increased expression of cancer stem cell markers. These cells are resistant to anticancer drugs. When the expression of molecules highly expressed in tumor endothelial cells was suppressed, the expression of stem cell markers in the co-cultured cancer stem cells was decreased. The drug resistance to anticancer drugs was also weakened. In tumor tissues, cancer stem cell marker-positive cells were observed in the vicinity of tumor blood vessels. Among tumor blood vessels, cancer stem cells tended to be localized in the vicinity of vessels with high expression of tumor endothelial cell marker-positive blood vessels. The relationship between their expression and clinicopathological factors and prognosis are under investigation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：がん幹細胞 血管ニッチ 口腔がん 腫瘍血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の中でも、がん幹細胞は高い薬剤耐性、自己複製能を持っており、抗がん剤治療や放射線治療への抵抗性が高く、種々の治療により他のがん細胞が死滅した後にも生き残ることから、がんの再発や転移の原因となっている。

組織形成の中心を担う幹細胞は、再生医療やがんなどの治療への応用につながることから、近年では幹細胞研究が精力的に行われている。幹細胞の維持に関して、幹細胞を単離できてもその細胞だけでは未分化性を維持したまま培養を継続できないことから、その細胞が自立して増殖しているのではなく、他の細胞との相互作用により幹細胞性が維持されていると考えられている。現在では血管領域で組織幹細胞の維持がなされていると考えられており（血管ニッチ、perivascular niche）、がんにおいても脳腫瘍や大腸癌、皮膚癌などのがん幹細胞が血管領域をニッチとしていると報告されている（Calabrese C. Cancer Cell 2007, Yang Z.J. Cancer Cell 2008 など）。血管近傍に存在するがん幹細胞と血管内皮細胞との相互作用を理解することは、がん幹細胞を標的としたがん制御には重要である。

腫瘍血管は、がん組織へ栄養や酸素を供給し、転移の入り口になるなど、がんの進展や転移に重要な役割を果たしている。われわれはこれまで腫瘍血管を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞を分離・培養し、その性質を解析することで様々な異常性を見出してきた。DNA microarray 解析により正常血管内皮に比べて腫瘍血管内皮において発現が亢進している遺伝子として複数の腫瘍血管内皮マーカーを同定している（Brit J Cancer 2011, 2012, 2013, Int J Cancer 2011, 2015, Cancer Sci 2014, Pathol Int 2012, 2013 2016 など）。それらの中には炎症性サイトカインやケモカイン、それらの受容体などがある。われわれはこれまでにケモカインレセプターCXCR7が口腔がんの腫瘍血管内皮において発現が亢進しており、局所再発等の予後と関連があることを見出した（Pathol Int 2021）。がん幹細胞の維持に重要な COX-2 や SDF-1, IL-6 などの angiocrine factor とよばれる様々なサイトカインの発現も口腔がんの腫瘍血管内皮において亢進していることを見出しており（Brit J Cancer 2011, Am J Pathol 2012 など）、さらに腫瘍血管内皮から分泌される Biglycan がパラクラインでがん細胞に作用し、がんの血管内侵入ならびに肺転移を促進することを報告した（Sci Rep 2016）。本研究では、口腔がん幹細胞と口腔がん血管内皮細胞の間にも Cross talk が存在するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまで見出してきた腫瘍血管内皮細胞の特徴を踏まえ、口腔がんにおいて腫瘍血管内皮細胞が様々な angiocrine factor を分泌してがん幹細胞ニッチを形成していると仮説を立て、それらの分子機構を明らかにし、口腔がん幹細胞血管ニッチを標的とした新しいがん治療法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 口腔がんにおけるがん幹血管ニッチの観察

口腔がんにおけるがん幹細胞の局在について、組織免疫染色法により可視化し、腫瘍血管との位置関係を明らかにする。血管内皮細胞は CD31 で可視化し、がん幹細胞は幹細胞マーカーとして用いられている ALDH、PSF-1 等を用いる。

(2) がん幹細胞の抗がん剤耐性や未分化能の維持における、腫瘍血管内皮由来 angiocrine factor の役割の解明とその制御

がん幹細胞と腫瘍血管内皮細胞の分離・培養

上記がん幹細胞マーカーの発現や ALDH 活性などを指標に、フローサイトメーターFACS Aria を用いてがん幹細胞を分離する。腫瘍血管内皮細胞はヒト口腔がん細胞株のマウス移植モデルから腫瘍血管内皮細胞を分離する。分離には、磁気細胞分離装置 MACS とセルソーターFACS Aria を用いて CD31+CD45 の血管内皮分画を採取する。

がん幹細胞と腫瘍血管内皮細胞の相互作用解析

がん幹細胞を腫瘍血管内皮細胞と共培養し、もしくはがん幹細胞に腫瘍血管内皮細胞の培養上清を処理し、がん幹細胞のシスプラチンなどの抗がん剤に対する抵抗性の変化と未分化性の維持を解析する。PCR 法でがん幹細胞マーカーの発現変化を解析し、さらに他の抗癌剤に対する抵抗性を検討する。

がん幹細胞血管ニッチ形成に関与する腫瘍血管内皮由来 angiocrine factor の同定
上記機能解析において変化をもたらす腫瘍血管内皮由来因子について、腫瘍血管内皮細胞の培

養上清を用いて定量的に解析する。分子の同定後、当該分子に対する阻害剤やレセプター阻害剤、siRNA などを用いて発現や機能を抑制し、腫瘍血管内皮由来 angiocrine factor ががん幹細胞にもたらす影響がキャンセルされるかどうか解析する。

(3) がん患者の手術摘出組織検体を用いた病理学的解析

上記で得られた知見が、ヒト臨床検体にもあてはまるかどうか、口腔がんのヒト臨床検体を用いて組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 口腔がんにおけるがん幹血管ニッチの観察

腫瘍血管の近傍でがん幹細胞マーカー陽性細胞が観察された。腫瘍血管の中でも、腫瘍血管内皮細胞マーカーを高発現している血管の近傍に癌幹細胞が局在している傾向がみられた。

(2) がん幹細胞の抗がん剤耐性や未分化能の維持における、腫瘍血管内皮由来 angiocrine factor の役割の解明とその制御

がん幹細胞と腫瘍血管内皮細胞の分離・培養

腫瘍血管内皮細胞の分離・培養を行い、それらの細胞が血管内皮細胞マーカー陽性で、腫瘍細胞や他の間質細胞のマーカーが陰性であることを PCR 法やフローサイトメトリーにて解析し、純度を確認した。また、管腔形成能を有していることを検討し、機能的にも血管内皮細胞であることを確認した。

がん幹細胞と腫瘍血管内皮細胞の相互作用解析

がん幹細胞を腫瘍血管内皮細胞と共培養、もしくはがん幹細胞に腫瘍血管内皮細胞の培養上清を処理したがん細胞にて、がん幹細胞マーカーの発現が亢進した。また MTS アッセイにおいて、それらの細胞が抗がん剤パクリタキセルに対する薬剤耐性を示した。

がん幹細胞血管ニッチ形成に関与する腫瘍血管内皮由来 angiocrine factor の同定

腫瘍血管内皮細胞において発現が高い分子の siRNA を用いて発現を抑制したところ、がん幹細胞における幹細胞マーカーの発現が低下した。また抗がん剤に対する薬剤抵抗性が減弱した。

(3) がん患者の手術摘出組織検体を用いた病理学的解析

口腔がん組織検体を用いて着目した分子の発現解析を行った。いくつかの症例において、腫瘍血管で発現が高いことが見出された。今後、それらの発現と臨床病理学的因子、予後との関連などを検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morimoto Masahiro, Maishi Nako, Tsumita Takuya, Alam Mohammad Towfik, Kikuchi Hiroshi, Hida Yasuhiro, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Annan Dorcas A., Takeda Ryo, Kitagawa Yoshimasa, Hida Kyoko	4. 巻 13
2. 論文標題 miR-1246 in tumor extracellular vesicles promotes metastasis via increased tumor cell adhesion and endothelial cell barrier destruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2023.973871	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 Yu Li, Maishi Nako, Akahori Erika, Hasebe Akira, Takeda Ryo, Matsuda Aya Yanagawa, Hida Yasuhiro, Nam Jin Min, Onodera Yasuhito, Kitagawa Yoshimasa, Hida Kyoko	4. 巻 113
2. 論文標題 The oral bacterium Streptococcus mutans promotes tumor metastasis by inducing vascular inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3980 ~ 3994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15538	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 Maishi Nako, Sakurai Yu, Hatakeyama Hiroto, Umeyama Yui, Nakamura Takashi, Endo Rikito, Alam Mohammad Towfik, Li Cong, Annan Dorcas Akuba Muhyia, Kikuchi Hiroshi, Morimoto Hirofumi, Morimoto Masahiro, Akiyama Kosuke, Ohga Noritaka, Hida Yasuhiro, Harashima Hideyoshi, Hida Kyoko	4. 巻 113
2. 論文標題 Novel antiangiogenic therapy targeting biglycan using tumor endothelial cell specific liposomal siRNA delivery system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1855 ~ 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15323	査読の有無 無
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 Yanagiya M, Dawood RIH, Maishi N, Hida Y, Torii C, Annan DA, Kikuchi H, Yanagawa Matsuda A, Kitamura T, Tei K, Shindoh M, Tanaka S, Kitagawa Y, *Hida K	4. 巻 71
2. 論文標題 Correlation between endothelial chemokine receptor 7CXCR7 expression and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol. Int.	6. 最初と最後の頁 383-391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13094	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 Maishi N, Sakurai Y, Hatakeyama H, Umeyama Y, Nakamura T, Endo R, Alam MT, Li C, Annan DA, Kikuchi H, Morimoto H, Morimoto M, Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Harashima H, *Hida K	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel antiangiogenic therapy targeting biglycan using tumor endothelial cell-specific liposomal siRNA delivery system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 間石奈湖, 樋田京子	4. 巻 53
2. 論文標題 腫瘍血管内皮細胞における異常性解明とその制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 間石奈湖, Annan DA, 樋田京子	4. 巻 28 (5)
2. 論文標題 がん治療標的としての腫瘍血管内皮細胞の特異性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yanagiya M, Dawood RIH, Nako Maishi N, Yasuhiro Hida Y, Chisaho Torii C, Hiroshi Kikuchi H, Aya Yanagawa, Matsuda A, Tetsuya Kitamura T, Tei K, Shindoh M, Tanaka S, Kitagawa Y, Hida K	4. 巻 71 (5)
2. 論文標題 Correlation between endothelial chemokine receptor 7CXCR7 expression and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Maishi N, Hida K
2. 発表標題 “Promotion of tumor metastasis by tumor endothelial cells (腫瘍血管内皮細胞による転移促進)”
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, International Sessions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間石奈湖, 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍微小環境における腫瘍血管の異常性とがん悪性化
3. 学会等名 第60回日本口腔科学会北日本地方部会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹川英輝, 間石奈湖, 松田 彩, Alam MT, 樋田泰浩, 北川善政, 樋田京子
2. 発表標題 Biglycanを標的とした新規血管新生阻害剤候補薬の検討
3. 学会等名 第125回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間石奈湖, 武田 遼, 松田 彩, 樋田京子
2. 発表標題 腫瘍細胞と腫瘍血管内皮細胞のCell cluster形成による転移促進
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間石奈湖, 梅山悠伊, 菊地 央, 古御堂 純, 佐藤峰嘉, 武田 遼, Jia Zi, 篠原信雄, 樋田泰浩, 樋田京子
2. 発表標題 がん細胞 - 腫瘍血管内皮細胞クラスター形成によるがん転移促進
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間石奈湖
2. 発表標題 「がん微小環境の基礎と臨床」, “腫瘍血管内皮細胞とがんの悪政化”,
3. 学会等名 第121回北海道癌談話会春季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間石奈湖, 樋田京子
2. 発表標題 ” がんの悪性化における腫瘍血管の役割 ”
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間石奈湖, 樋田京子
2. 発表標題 “ がんにおける血管の役割とがんの悪性化 ”
3. 学会等名 第66回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間石奈湖, 菊地 央, 樋田泰浩, 篠原信雄, 樋田京子
2. 発表標題 抗癌剤治療がもたらす腫瘍血管トランスポーター発現亢進とその機序
3. 学会等名 第6回北海道大学部局横断シンポジウム “若手研究者による生命と物質の融合を目指して！”, (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間石 奈湖, 梅山 悠伊, 菊地 央, 古御堂 純, 佐藤 峰嘉, 武田 遼, Dorcas A. Annan, 篠原 信雄, 樋田 泰浩, 樋田 京子
2. 発表標題 Crosstalk of tumor cells and tumor endothelial cells by forming cell clusters promotes tumor metastasis
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hida K, Maishi N, Takeda R, Hida Y	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Exon Publications	5. 総ページ数 198
3. 書名 Metastasis	

〔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	菊地 奈湖 (間石奈湖) (Kikuchi Nako) (00632423)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	ANNAN DORCAS・AKU BAMUHYIA (Annan Dorcas Akubamuhya) (30837240)	北海道大学・歯学研究院・学術研究員 (10101)	削除：2021年2月9日

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