

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390465

研究課題名(和文) 癌幹細胞を制御する転写因子 Brachyury を標的とした口腔癌分化誘導療法の開発

研究課題名(英文) Developing of differentiation inducing therapy on oral cancer by targeting transcription factor Brachyury which regulates cancer stem cells

研究代表者

杉浦 剛 (Sugiura, Tsuyoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40322292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000 円、(間接経費) 4,350,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した ACCS GFP より高転移性で癌幹細胞形質を示す ACCS-M GFP を分離した。さらに、ACCS-M GFP の癌幹細胞形質の制御に T-box 転写因子 Brachyury および SOX2 が関与しており、特に Brachyury は SOX2 の発現も制御する癌幹細胞の制御因子であることを明らかにした。Brachyury をノックダウンする事により、癌幹細胞の浸潤抑制、抗癌剤および放射線に対する耐性減弱、造腫瘍性・転移能の抑制が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that the T-box transcription factor Brachyury is a potential regulator of cancer stem cells (CSCs). Specifically, growth of CSCs was controlled by Brachyury knockdown in AdCC. Since CSCs are resistant to chemotherapy and radiotherapy, this finding provides a new principle for therapies targeting CSCs. In the present study, we established that Brachyury knockdown suppresses chemo- and radioresistance in vitro. Brachyury was knocked down by transfecting Brachyury short hairpin RNA (shRNA) in to the AdCC CSC cell line, ACCS-M GFP. Brachyury knockdown significantly inhibited cell migration and invasion and suppressed chemoresistance. Furthermore, ACCS-M GFP radioresistance was significantly suppressed by Brachyury knockdown. Brachyury knockdown significantly sensitized ACCS-M GFP cells to chemoradiotherapy. This study demonstrates that Brachyury knockdown reduces invasiveness and chemo- and radioresistance of CSCs in vivo.

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：Brachyury 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の遠隔臓器への転移は生命予後と直接関係する悪性形質である。口腔癌においては手術手技や診断精度の向上により転移のない症例の5年生存率はステージにあまり影響をうけず、約85%である。(九州大学病院顎顔面口腔外科の治療成績)一方で転移をきたした症例では原発巣の大きさにかかわらず、5年生存率は60-70%と急激に低下し、転移の制御が口腔癌の治療成績向上の最大の命題となっている。しかしながら、現在の癌治療の主眼は原発巣の制御になっており、化学療法・放射線治療も転移に対する有効な予防法・治療法とはなりえないことが知られている。他領域では分子標的治療が開始されているが、限られた症例にのみ効果があることが報告されている。すなわち、がん転移の予防法・治療法の開発が急務である。

近年、がん幹細胞の存在が提唱され、幹細胞が治療抵抗性を示すことから新しいがん治療の標的として注目されている。がん幹細胞は薬物治療や放射線治療に抵抗性があるばかりか、局所浸潤能や転移能を示す。すなわち転移を制御する治療のストラテジーにおいてがん幹細胞を治療標的にすることは必須である。

われわれの実験系でも腺様嚢胞癌細胞株を舌に接種し、造腫瘍性を獲得した細胞株、顎下リンパ節に転移を起こす細胞株を *in vivo selection* によって樹立したところ、100%の造腫瘍性、転移能をもつ細胞を樹立しているばかりか、幹細胞様の性格を有することを明らかにした。このことは、がんの細胞集団のなかで転移を引き起こす細胞集団はがん幹細胞であるという仮説を裏付けるものである。

未分化マーカーの1つである Brachyury は T-box ファミリーに属する転写因子である。発生においては上皮と間葉のスイッチを担

う因子としても知られている。興味深いことに、がん幹細胞様細胞に Brachyury をノックアウトすると他の未分化マーカーも同時に全て親株レベルの発現に低下した。さらに上皮間葉移行の現象も消失した。

このことは Brachyury が癌幹細胞の維持・制御を行う中心的因子であることを示唆している。

これまでの研究成果から Brachyury はがん幹細胞を分化させる可能性がある。このように分化した癌細胞は抗癌剤や放射線治療に反応すると考えられる。つまり、従来の化学療法・放射線治療に先駆けて、癌部で Brachyury をノックアウトしてやることで治療成績を飛躍的に向上させる可能性がある。

一方で、癌部におけるノックアウトの技術については十分な配慮が必要である。正常細胞にも幹細胞が存在しており、全身でのノックアウトにおける副作用は予想できない。つまり癌部に選択的にデリバリーする方法の開発が必要と考えられる。そこで以下の研究目的およびゴールを設定した。

2. 研究の目的

(1) 口腔癌の各種培養細胞を用いた幹細胞分離を行い、網羅的なキャラクター解析を行う。マーカーとなる遺伝子を明らかにする。また、治療に対する耐性(薬剤耐性・放射線耐性)について明らかにする。さらに Brachyury が幹細胞維持の責任遺伝子であるかを確認する。

(2) 幹細胞の Brachyury ノックダウンにより、薬剤耐性・放射線耐性が消失するか明らかにする。

(3) 癌部への選択的 Brachyury ノックダウンが可能なシステムを開発する。

(4) 治療効果について検証する。 同所移植の自然転移モデルにおける転移および原発巣への治療効果を病理学的・分子生物学的に検討する。

3. 研究の方法

プロジェクト 1. がん幹細胞の分離法の確立とキャラクター解析

in vivo selection による幹細胞分離とマイクロアレイによる網羅的解析を行う。

Brachyury によるがん幹細胞制御が他の細胞腫でも共通であるか検証する。

プロジェクト 2. がん幹細胞への遺伝子導入による分化誘導の検討

幹細胞の責任遺伝子を明らかにしてこれを導入することによる分化誘導をめざす。

特にすでに明らかになっている Brachyury ノックアウトによる分化誘導を検討する。

プロジェクト 3. がん幹細胞を標的とした新規遺伝子導入技術の開発

癌幹細胞選択的 Brachyury ノックアウトを開発する。ナノスフィア法を応用する予定である。

プロジェクト 4. In vivo がん転移モデルでの応用

in vivo モデルにおける癌幹細胞選択的 Brachyury ノックアウトの有用性を確認する。

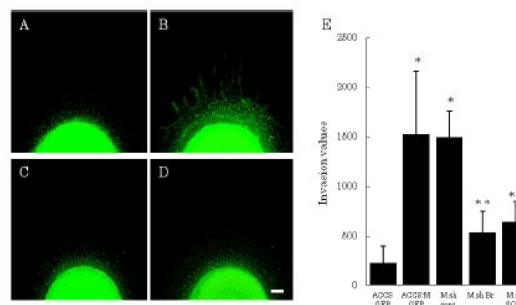
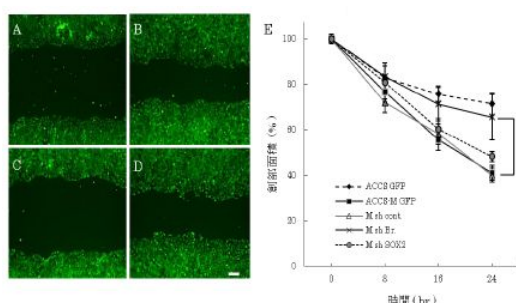
4. 研究成果

腺様嚢胞癌は、著明な浸潤増殖や肺などへの転移を特徴とする悪性度の高い腫瘍である。さらに、抗癌剤や放射線に耐性を示すことが知られており、外科的療法以外に標準的な治療がなく、その治療は困難を極める。近年、様々な癌腫において治療耐性の原因として癌幹細胞の存在が指摘されており、腺様嚢胞癌に対しても癌幹細胞を標的とした治療法の確立が必須である。当分野では培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した ACCS GFP より高転移性で癌幹細胞形質を示す ACCS-M GFP を分離した。さらに、ACCS-M GFP の癌幹細胞形質の制御に T-box 転写因子 Brachyury および SOX2 が関与しており、特に Brachyury は SOX2 の発現も制御する癌幹細胞の制御因子であることを明らかにしている。しかし、抗癌剤や放射線耐性に

対する癌幹細胞の関与は不明な点が多いばかりか、癌幹細胞を標的とした遺伝子治療の可能性については、ほとんど検討されていない。そこで、本研究では癌幹細胞 ACCS-M GFP を使い、Brachyury のノックダウンにより癌幹細胞の遊走能、浸潤能に対する効果 抗癌剤、放射線感受性に対する効果 造腫瘍性および転移能の抑制効果について検討した。

A in vitro における Brachyury ノックダウンの腫瘍の浸潤に与える効果

ACCS-M GFP は in vitro (原発巣離脱モデル、Wound healing assay) において、ACCS GFP と比較して著明な浸潤能の亢進を認めた。ACCS-M GFP において、Brachyury あるいは SOX2 を short hairpin RNA (sh RNA) を用いてノックダウンすると (それぞれ ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP)、ACCS-M sh Br. GFP は ACCS GFP と同程度まで浸潤能が抑制された。



B in vitro における Brachyury ノックダウンが抗癌剤および放射線耐性に与える効果

ACCS-M GFP は ACCS GFP よりも抗癌剤に強い耐性をもつことが、生細胞率に基づいた抗癌剤感受性試験により確認された。ACCS-M sh

Br. GFP では ACCS GFP と同程度まで抗癌剤耐性が減弱した。また、ACCS-M GFP は ACCS GFP と比較して放射線にも強い耐性を示すことが、生細胞率に基づいた放射線感受性試験により確認されたが、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP では ACCS GFP 程度まで放射線に対する耐性が減弱した。さらに、抗癌剤と放射線の同時併用を行うと、単独使用と比較して ACCS-M sh Br. GFP において、特に抗癌剤耐性の減弱を認めた。ABC, SLC トランスポーター遺伝子の発現は ACCS-M GFP で発現亢進しており、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP において発現が減弱した。

表2. 各種抗癌剤における IC₅₀値

Anti-cancer drug	IC 50 (nM)				
	ACCS GFP	ACCS-M GFP	M sh cont.	M sh Br.	M sh SOX2
cisplatin	353.4	527.6	529.1	360.2	403.4
5-Fluorouracil	463.5	842.9	835.1	623.7	673.6
docetaxel	0.9	320.5	315.8	104.5	248.5
paclitaxel	0.75	17.3	18.5	6.7	18.8
actinomycin D	3.9	43.6	42.1	27.5	35.5
mitomycin C	33.8	49.8	47.1	40.2	48.2
bleomycin	41.1	57.8	58.6	50.2	55.8
bestatin	459	558.8	549.3	306.7	325
etoposide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 検出できず

C in vivoにおけるBrachyuryノックダウンの造腫瘍性、転移能に与える効果

ヌードマウスを用いた造腫瘍性・転移能実験において ACCS-M GFP と比較して ACCS-M Br. sh GFP では、造腫瘍性 50%、転移能 0% に減弱しており、ACCS-M sh SOX2 GFP でも ACCS-M GFP のそれぞれ造腫瘍性 87.5%、転移能 87.5% に減弱した。

表3. 各種の ACCS 細胞の腫瘍および転移形成率

cell lines	腫瘍形成率		転移形成率	
	腫瘍形成 /接種頭数(%)	平均腫瘍体積 (mm ³)	頸下リンパ節転移 /接種頭数(%)	肺転移-接種頭数(%)
ACCS-M GFP	8/8 (100%)	145.3	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)
M sh cont.	8/8 (100%)	121.4	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)
M sh Br.	4/8 (50%)	28.3	N.D.	N.D.
M sh SOX2	7/8 (87.5%)	37.2	7/8 (87.5%)	3/8 (37.5%)

N.D.: 検出できず

以上の結果から、Brachyury をノックダウンする事により、癌幹細胞の浸潤抑制、抗癌剤および放射線に対する耐性減弱、造腫瘍性・転移能の抑制が可能であることが示唆され、癌幹細胞を標的とした遺伝子治療の有な標的分子となり得ること考えられた。

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 6件)

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. *International journal of oncology* **38**, 921-931, doi:10.3892/ijo.2011.917 (2011)

Chigita, S., Sugiura, T*, Abe, M., Kobayashi, Y., Shimoda, M., Onoda, M. & Shirasuna, K. CD82 inhibits canonical Wnt signalling by controlling the cellular distribution of beta-catenin in carcinoma cells. *International journal of oncology* **41**, 2021-2028, doi:10.3892/ijo.2012.1671 (2012).

Imajyo, I., Sugiura, T*, Kobayashi, Y., Shimoda, M., Ishii, K., Akimoto, N., Yoshihama, N., Kobayashi, I. & Mori, Y. T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* **41**, 1985-1995, doi:10.3892/ijo.2012.1673 (2012).

Shimoda, M., Sugiura, T*, Imajyo, I., Ishii, K., Chigita, S., Seki, K., Kobayashi, Y. & Shirasuna, K. The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC cancer*

12, 377, doi:10.1186/1471-2407-12-377 (2012).

Fujinaga T, Kumamaru W, Sugiura T, Kobayashi Y, Ohyama Y, Ikari T, Onimaru M, Akimoto N, Jogo R, Mori Y. Biological characterization and analysis of metastasis-related genes in cell lines derived from the primary lesion and lymph node metastasis of a squamous cell carcinoma arising in the mandibular gingiva. *International journal of oncology* **44**, 1614-1624, doi:10.3892/ijo.2014.2332 (2014).

Kobayashi Y, Sugiura T, Imajyo I, Shimoda M, Ishii K, Akimoto N, Yoshihama N, Mori Y. Knockdown of the T-box transcription factor Brachyury increases sensitivity of adenoid cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: implications for a new therapeutic principle. *International journal of oncology* **44**, 1107-1117, doi:10.3892/ijo.2014.2292 (2014).

〔学会発表〕(計 4 件)

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 48 回口腔組織培養学会、千葉、2011.

Mine M., Sugiura T., Chigita S., Yoshihama N., Akimoto N., Jogo R., Hiyake N., Mori Y. CD82 inhibits canonical Wnt signalling by controlling the cellular distribution of -catenin in carcinoma cells. 21st International Conference on Oral and

Maxillofacial Surgery, Barcelona, Spain (2013)

Jogo R., Sugiura T., Chigita S., Yoshihama N., Akimoto N., Mine M., Mori Y. T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Barcelona, Spain (2013)

杉浦剛：口腔癌幹細胞を標的とした治療ストラテジー、第 50 回日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会シンポジウム、東京、2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA Tsuyoshi)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40322292

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：