

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592522

研究課題名(和文) 癌幹細胞理論にもとづく上咽頭癌発癌機構の解明

研究課題名(英文) Cancer stem cell model and nasopharyngeal carcinogenesis

研究代表者

室野 重之 (Murono, Shigeyuki)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：20345622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：上咽頭上皮細胞において、Epstein-Barrウイルスの癌蛋白であるLatent membrane protein 1(LMP1)の形質導入により、以下のことが判明した。1)細胞形態および細胞に発現する蛋白のパターンから、転写因子であるTwistおよびsnailを介して上皮間葉移行が誘導されている。2)LMP1発現細胞はCD44高発現、CD24低発現であり、癌幹細胞様表現形式である。したがって、LMP1により癌幹細胞様形質が獲得されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Association of Epstein-Barr virus (EBV) with nasopharyngeal carcinoma is known. However, mechanism of nasopharyngeal carcinogenesis is not clarified yet. In the present study, we showed that EBV latent membrane protein 1 (LMP1), a viral oncoprotein, induced a cellular morphological change as well as epithelial-mesenchymal transition through transcription factors including Twist and snail in nasopharyngeal epithelial cells. Furthermore, comparison of expression of ABCG2, Nanog, Nestin, Oct4, KLF4 and c-Myc between cells with and without LMP1 expression revealed that LMP1 induced cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines.

研究分野：医学(耳鼻咽喉科学)

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：上咽頭癌 EBウイルス LMP1 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 上咽頭癌は分化度に基づいて3タイプ、すなわち WHO-I 型(角化型)・II 型(低分化型)・III 型(未分化型)に分類されている。このうち、I 型の組織からは Epstein-Barr ウイルス (EBV) の DNA が検出されないが、II 型および III 型ではほぼ 100%の腫瘍において EBV の DNA が検出される。上咽頭癌の約 90%は II 型ないし III 型であり、70%以上の患者は初診時にリンパ節転移を有する、すなわち高転移性である。

(2) 細胞の脱分化現象は上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) の一現象と考えられているが、近年では「正常組織の癌化に伴い一部の組織が EMT 現象を起こす。そして、移動能を獲得することにより転移が生じる」という考えにより、転移と EMT は同一の現象と認知されている。

(3) 一方、幹細胞研究の急速な発展により、癌にも正常組織同様のヒエラルキーが存在し、その頂点に位置する癌幹細胞のみが強力な自己複製能と癌形成能を有するという癌幹細胞理論が腫瘍となって来た。そして、今日、EMT は癌幹細胞理論の骨格を支える現象と認識されている。

2. 研究の目的

(1) 上咽頭癌は EBV 関連腫瘍である。しかし、その発癌メカニズムは十分に解明されていない。近年の発生学・再生医学の進歩から「癌化」の概念がリセットされ、癌にも幹細胞が存在し、前駆細胞、機能細胞へと分化していくという癌幹細胞理論が一般化して来た。本研究では、上咽頭組織の癌化を癌幹細胞理論の視点でとらえた場合に、EBV 感染がどのような役割を占めるのかについて検討する。

(2) そのために、「EBV は上咽頭癌幹細胞を誘導する」という仮説をたて、EBV の古典的な癌蛋白とされる latent membrane protein 1

(LMP1) による癌細胞の脱分化現象を発生学・再生学的現象である EMT の側面からとらえ、LMP1 による EMT の中心的制御因子 snail・Twist 活性化と EMT 誘導機構を検証し、その結果、細胞が癌幹細胞の形質に変化するかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 上咽頭上皮細胞である Ad-AH 細胞を使用し、コントロールレトロウイルスベクターおよび LMP1 発現レトロウイルスベクターを導入する。コントロール細胞と LMP1 導入細胞において、形態の変化を観察し、フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットにより CD44 と CD24 の発現を検討する。自己複製能についてはスフェアアッセイにより、腫瘍能については、ソフトアガーアッセイおよびヌードマウスへの細胞移植による腫瘍形成により検討する。

(2) EBV 陽性上咽頭癌細胞である C666-1 において LMP1 に対する siRNA を用いて LMP1 の機能を抑制することによる変化を観察する。

(3) コントロール細胞および LMP1 導入細胞において、EMT の指標となる因子の発現を RT-PCR およびウェスタンブロット、免疫蛍光法により検討する。

(4) コントロール細胞および LMP1 導入細胞において、他の癌幹細胞形質マーカーの発現をフローサイトメトリー、免疫蛍光法およびウェスタンブロットにより検討する。

(5) LMP1 による activation-induced cytidine deaminase (AID) 活性化が脱分化した上皮幹細胞もしくは前駆細胞の遺伝子変異を促進し、癌幹細胞生成に促進的に働くことの解析の予備実験として、口腔癌における AID 発現を免疫染色により検討する。

4. 研究成果

(1) 形態的には、コントロール細胞は親細胞 (Ad-AH) と変化がないのに対し、LMP1 導

入細胞では紡錘形に変化した。また、増殖様式は、親細胞 (Ad-AH) およびコントロール細胞は塊状であるのに対し、LMP1 導入細胞ではバラバラであることが観察された。これは、EMT の形態的特徴に合致し、LMP1 による EMT の可能性がうかがわれた。

(2) フローサイトメトリーにより、コントロール細胞に比べ LMP1 導入細胞では CD44 の発現が高く CD24 の発現が低いことが判明した。また、ウェスタンブロットにおいても、コントロール細胞では CD24 の発現が強く CD44 の発現は微弱、LMP1 導入細胞では CD24 の発現が微弱で CD44 の発現が強く見られた。

(3) スフェア形成はコントロール細胞に比べ LMP1 導入細胞では約 3 倍であり、有意な差が確認できた ($p < 0.05$)。これは LMP1 による自己複製能の増強を示唆する。また、軟寒天における細胞増殖はコントロール細胞に比べ LMP1 導入細胞では約 7 倍多いコロニーが形成され、さらに個々のコロニーも大きかった。

ヌードマウスへの移植による腫瘍形成は、コントロール細胞では 0% であるのに対し、LMP1 導入細胞では 63% であった。これらの結果は、LMP1 による腫瘍形成能の増強を示唆する。

(4) LMP1 を発現する C666-1 細胞において、LMP1 に対する siRNA は LMP1 の発現を減弱させたがコントロール siRNA では変化がなかった。フローサイトメトリーにより、C666-1 細胞では LMP1 に対する siRNA はコントロール siRNA に比べ、CD44 低発現、CD24 高発現へと変化することが確認された。これらは、LMP1 の機能抑制により CD44 および CD24 の発現パターンが変化することを示唆する。

(5) RT-PCR による mRNA 発現およびウェスタンブロットによる蛋白発現を検討したところ、コントロール細胞および LMP1 導入細胞では、Twist の発現がそれぞれ低および高、snail の発現がそれぞれ低および高、

E-cadherin の発現がそれぞれ高および低、N-cadherin の発現がそれぞれ低および高、fibronectin の発現がそれぞれ低および高、vimentin の発現がそれぞれ低および高いことが示された。また、これらの結果は免疫蛍光法でも同様の結果であった。コントロール細胞の発現パターンは上皮系であり、LMP1 導入細胞の発現パターンは間葉系であることから、LMP1 は EMT を誘導することが示唆された。

(6) 今までの結果は LMP1 により癌幹細胞様形質が誘導されることを示唆している。さらに他の癌幹細胞様形質のマーカーについてフローサイトメトリーにより検討すると、コントロール細胞に比べて LMP1 導入細胞では、CD133、ABCG2、EpCAM の発現が見られ、さらに CD29 (1 インテグリン)、CD49b (2 インテグリン)、CD49f (6 インテグリン) の発現も確認された。またウェスタンブロットおよび免疫蛍光法により、LMP1 導入細胞ではコントロール細胞に比べ、サイトケラチン (CK)14 および CK19 の発現が高く CD18 の発現が低いことが示された。これは LMP1 により細胞が未分化傾向となっていることを示唆する。

(7) 癌幹細胞では一般に ABCG2 が陰性で癌前駆細胞では陽性であるとされている。(6) の結果では ABCG2 陽性であるため、LMP1 により厳密には癌前駆細胞が誘導されるものと思われた。RT-PCR による mRNA 発現およびウェスタンブロットによる蛋白発現を検討したところ、コントロール細胞および LMP1 導入細胞では、ABCG2 の発現がそれぞれ低および高、Nanog の発現がそれぞれ高および低、Nestin の発現がそれぞれ高および低、Oct4 の発現がそれぞれ高および低、KLF4 の発現がそれぞれ低および高、c-Myc の発現がそれぞれ低および高いことが示された。これらの結果は LMP1 により癌前駆細胞が誘導されることを示唆する。

(8) 口腔癌 27 例における AID に対する免疫染色では、正常粘膜では染色は見られなかったが、癌では 10 例 (37%) において発現を認めた。T1+T2 群の方が T3+T4 群よりも有意に高率に発現していた ($p < 0.05$)。非転移性のモデルとして HSC-2 細胞、転移性モデルとして HSC-3 細胞を用いて RT-PCR により AID の発現を検討すると、前者において検出される一方、後者では検出されなかった。これらの結果は、口腔粘膜上皮において AID は癌のイニシエーションに関与していることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Zen Y, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 331(1): 52-7, 2013. 査読有 .Doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.002

Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Tsuji A, Endo K, Murono S, Ito M, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Role of activation-induced cytidine deaminase in the development of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8(4): e62066, 2013. 査読有 . Doi: 10.1371/journal.pone.0062066.

Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, Zen Y, Endo K, Murono S, Sugimoto H, Yamada S, Pagano JS, Yoshizaki T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal cell lines. *J Virol* 85(21): 11255-11264, 2011. 査読有 . Doi: 10.1128/JVI.00188-11.

[学会発表] (計 2 件)

中西庸介 .Activation-induced cytidine deaminase (AID)に着目した口腔発癌機構 . 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会 . 2012 年 5 月 9 日 . 新潟 .

近藤 悟 . EBV により上咽頭癌幹細胞は誘導されるか〜第二報〜 . 第 35 回日本頭頸部癌学会 . 2011 年 6 月 9 日 . 名古屋 .

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等はなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室野 重之 (MURONO, Shigeyuki)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号 : 20345622

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI, Tomokazu)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 70262582

脇坂 尚宏 (WAKISAKA, Naohiro)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号 : 70377414

近藤 悟 (KONDO, Satoru)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号 : 70436822