

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592613

研究課題名(和文) 超免疫不全マウスを用いた新規頭頸部がん幹細胞マーカー探索と特異的治療法開発

研究課題名(英文) Identification of a Cancer stem cell marker and therapeutic target by xenotransplantation methods

研究代表者

松浦 一登 (MATSUURA, KAZUTO)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：70271947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭頸部癌の癌幹細胞を同定し、特徴的に発現する細胞マーカー分子の解析を行った。臨床検体を超免疫不全NOGマウスに移植することによって新たなPDX細胞株HPCMの樹立に成功した。CD271の発現と腫瘍形成に明らかな相関を認めた。スフェアアッセイではCD271の発現が増加していたほか、CD271陽性細胞は化学療法抵抗性を示した。下咽頭癌患者検体を用いたCD271の免疫染色とmRNAの定量PCRでは、いずれもCD271を高発現する症例は有意に予後不良であった。CD271は下咽頭癌幹細胞の新たなマーカー分子であり、新規治療標的として有望であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells contribute to the malignant phenotypes of a variety of cancers, but markers to identify human head and neck cancer (HNSCC) stem cells remain poorly understood. We found that CD271+ population sorted from xenotransplanted HNSCC possesses an enhanced tumor-initiating capability in immunodeficient mice. Tumors generated from the CD271+ cells contained both CD271+ and -negative cells, indicating that the population could undergo differentiation. In accordance with these characteristics, a stemness marker, Nanog, and matrix metalloproteinases (MMPs), which are implicated in cancer invasion, were significantly up-regulated in the CD271-positive compared to the -negative cell population. Furthermore, using primary specimens, we found that high CD271 expression was correlated with a poor prognosis for patients. Together, the present findings indicate that CD271 is a novel marker for HNSCC stem-like cells and for the prognosis.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：癌 頭頸部癌 超免疫不全マウス がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、呼吸、嚥下等の生体機能を損なうことから、単に生命予後のみならず Quality of Life の観点からもその克服が急務である。頭頸部癌の大部分を占める扁平上皮癌は、強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘤を形成しながら頭部・頸部さらに体幹へとリンパ管・静脈に沿って浸潤・転移する。

(2) 癌の浸潤・転移には「がん幹細胞」(Cancer Stem Cell, Cancer Initiating Cell) が必須の役割を果たしていることが判明した。がん細胞は正常体細胞と比較して、①増殖能の亢進、②不死化、③浸潤・転移、という特性を持つ。しかしながら、がん組織を構成するがん細胞のすべてが、これらの特徴を有しているわけではなく、実際に造腫瘍性を有するがん細胞は全体のごく一部に過ぎない。これら細胞は、胚性幹細胞および体性幹細胞等に共通して見られる、1) 自己複製能、2) 多潜能性、という2つの特徴を持ち、がん組織中で自己複製により同一の未分化形質を維持しながら大多数のがん細胞を生み出していると考えられている。「がん幹細胞」を悪性の起源とし、がんが発生・進行するという「がん幹細胞仮説」は頭頸部癌にも当てはまると想定されるが、頭頸部癌(扁平上皮癌)の幹細胞マーカーについては CD44 等の一部分子を除いて十分に解析されていなかった。

2. 研究の目的

ヒト頭頸部癌に焦点を当て、癌幹細胞を同定し、これら細胞集団に特徴的に発現する細胞マーカー分子の解析を目指す。頭頸部癌に含まれる癌幹細胞の特性を明らかにするために、頭頸部扁平上皮癌を対象として Hoechst 陰性サイドポピュレーション (SP 細胞) あるいは既知がん幹細胞マーカーを指標として細胞分画し、それらを超免疫不全マウス NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) に移植する。高腫瘍形成能細胞分画と低腫瘍形成能細胞分画について、網羅的な遺伝子発現を比較することで、がん幹細胞性を規定する新たな細胞表面マーカーの同定を行うことを目的とする。さらに、幹細胞性マーカーの発現との関連性、スフェア形成能との関連性を探る。さらに、一般にがん幹細胞に認められる抗癌剤耐性について解析する。また、患者予後との関連についても追求することで、新たながん幹細胞マーカーが診断マーカーとして有用であることを証明する。以上の解析により、in vitro および in vivo の両面から頭頸部癌における癌幹細胞の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞を用いたがん幹細胞の同定：がん幹細胞分画に用いられているマーカー(SP cell, CD44, CD133 等)の発現の有無

をフローサイトメトリーにて検討する。これらマーカーを用いて既存のセルソーターによって細胞を分画し、各細胞分画を NOG マウスに移植する。in vivo において腫瘍形成能が最も高い細胞分画、最も低い分画を同定し取得することで最良のがん幹細胞マーカーを決定する。さらに、関連分子についても解析を行うことで新規マーカーを同定する。

(2) in vitro における腫瘍形質の解析：項目1で選抜した細胞表面マーカーの発現に注目し、腫瘍形成能細胞が高い分画と低い分画について、in vitro での細胞増殖能、コロニー形成能等を比較検討する。

(3) 臨床検体を用いた新規がん幹細胞マーカー発現解析：手術にて切除した病理標本を用いて免疫組織染色による検討を行い、組織内のがん幹細胞の局在、血管との関係について解析する。

(4) 患者予後因子としての解析：臨床ステージとの関連、予後との関連との関係を解析することで診断マーカーとしての有用性がある解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト頭頸部癌に由来する PDX 株の構築：頭頸部癌細胞株として FaDu 等の細胞株を用いたところ、極めて少数の細胞 (1 から 10 細胞程度) によっても極めて高い造腫瘍能を呈した。癌幹細胞の同定は困難と判断し、次いで患者由来細胞を用いた解析を行った。切除検体を NOG マウスの皮下に異種移植し数代の継代を行った。その結果、複数の PDX(Patient-Derived Xenograft)株 HPCM を得た。HPCM2 は in vitro でも培養可能であり、以後の解析に使用した。

(2) 新規がん幹細胞マーカー CD271 の同定：CD44 の発現による造腫瘍能の差異は軽微であった。一方、粘膜基底層 (正常組織幹細胞) マーカー CD271 を検討したところ複数の細胞株で CD271+細胞群を認めた。

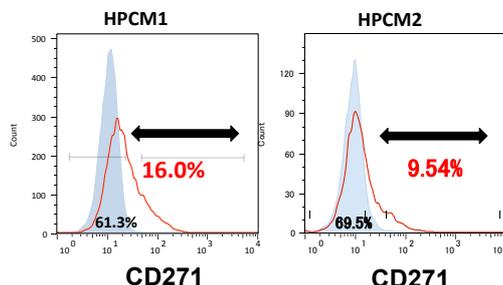


図1. PDX株においてCD271の高発現細胞集団が存在した CD271 発現によりセルソーターで細胞を分取したところ、CD271+分画では有意に腫瘍形成が高かった (表1)。

この結果から、CD271 は癌幹細胞マーカー候補としてさらに検討する意義があるものとかんがえられた。

(3) CD271 発現とスフェア形成能との関連：がん幹細胞は低栄養のスフェア培養培地において球状の塊 (スフェア) を形成すること

表1. NOGマウス皮下移植実験結果

移植細胞	細胞数	2週	4週	6週	8週	10週
CD271+	1,000	0/8	1/8	2/8	4/8	4/8
CD271-	1,000	0/8	0/8	1/8	1/8	1/8

◆CD271陽性細胞分画は高い造腫瘍性を示した
が知られている。実際に HPCM2 を用いてス
フェアを形成させることに成功した。そこで
スフェア形成細胞と *in vitro* 培養細胞を比較
検討することとした。FACS 解析の結果、明
らかにスフェア形成細胞では CD271 の発現
が亢進していた (図2)。

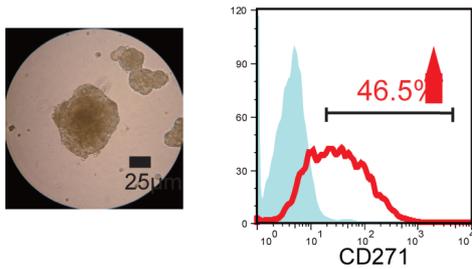


図2. スフェアを形成するHPCM細胞では
CD271発現が明らかに亢進していた

以上の結果は、CD271+細胞集団が、癌幹細胞性を有することを強く示唆するものと考えられた。

(4)薬剤耐性と CD271 の関連：HPCM2 を NOG マウスに移植して腫瘍を形成させ、CDDP を投与した。CDDP 投与前後で病理組織を解析したところ、投与後検体では明らかに CD271 発現が亢進していた。以上の結果から、CD271 発現細胞は癌幹細胞として重要な化学療法耐性という形質を示しているものと考えられた。(図3)

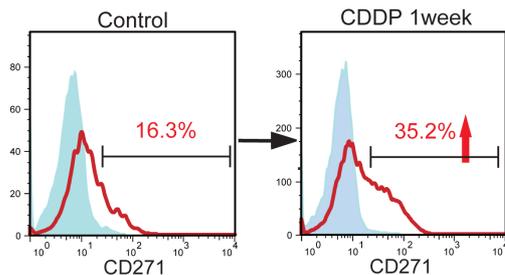


図3. CDDPによるin vivo化学療法後の腫瘍では
CD271の発現が上昇していた

(5) 下咽頭癌患者検体を用いて CD271 を免疫染色したところ、無再発期間と CD271 発現に有意な逆相関を認めた。さらにmRNA の定量 PCR を行い、mRNA と患者予後を調べたところ、CD271 を高発現する症例は有意に予後不良であることが確認された。以上の結果から、CD271 は下咽頭癌幹細胞の新たなマーカー分子であり、新規治療標的として有望であることが明らかとなった。CD271 発現の有無は患者予後との相関も認められたた

め、今後診断マーカーとしても有用である可能性が高いと考えられる。

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)

- Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 査読有り 2012:760-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x
- Watanuki, Z., Kosai, H., Osanai, N., Ogama, N., Mochizuki, M., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Fukuhara, T., Maemondo, M., Ichinose, M., Nukiwa, T., Tanaka, N. Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り 455, 2014:269-276. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.003
- Imai, T., Tamai, K., Oizumi, S., Oyama, K., Yamaguchi, K., Sato, I., Satoh, K., Matsuura, K., Saijo, S., Sugamura, K. and Tanaka, N.: CD271 defines a stem cell-like population 1 in hypopharyngeal cancer. *PLoS One*. 2013 8(4):e62002. doi: 10.1371/journal.pone.0062002. Print 2013.
- Homma, A., Hayashi, R., Matsuura, K., Kato, K., Kawabata, N., Monden, Y., Hasegawa, T., Onitsuka, Y., Fujimoto, S., Iwae, K., Okami, T., Matsuzuka, K., Yoshino, K., Nibu, T., Kato, H., Nishino, T., Asakage, I., Ota, M., Kitamura, A., Kubota, T., Ueda, K., Ikebuchi, Watanabe, A., Fujii, M.: Lymph node metastasis in T4 maxillary sinus squamous cell carcinoma: Incidence and treatment outcome. *Ann Surg Oncol*. 査読有り 234, 2014:277-288 DOI 10.1245/s10434-014-3544-6.
- Imai, T., Matsuura, K., Asada, Y., Sagai, S., Katagiri, K., Ishida, E., Saito, D., Sadayasu, R., Wada, H. and Saijo, S.: Effect of HMB/Arg/Gln on the prevention of radiation dermatitis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 査読有り 44:422-7. 2014

- doi:10.1093/jjco/hyu027
6. Sakashita, T. Homma, A., Hayashi, R., Kawabata, K., Yoshino, K. Iwae, S., Hasegawa, Y., Nibu, K., Kato, T. Shiga, K., Matsuura, K., Monden, N., Fuji, M.: The role of initial neck dissection for patients with node-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas. Oral Oncology 査読有り 50: 657-661. 2014 doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.03.003

[学会発表] (計 6件)

- ① Tanaka, N., Imai, T. Mochizuki, M. Sugawara, S., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Sugamura, K. CD271 defines a cancer initiating cell population in hypopharyngeal cancer. AACR2015, Philadelphia, PA, USA, 2014. 4
- ② Tanaka, N., Imai, T., Tamai, K. Mochizuki, M., Ogama, N., Yamaguchi, K., Satoh, K., Sugamura, K.,: PDX model for Head and Neck Cancer reveals functional significance of CD271⁺ cancer stem cells. 第73回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 横浜, 2014. 9
- ③ Mochizuki, M., Imai, T. Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Ogama, N., Yokoyama, M., Sugamura, K., Tanaka, N.: CD271 plays critical roles in invading cancer cells in hypopharyngeal carcinoma. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014. 9
- ④ Imai, T., Matsuura, K., Saijo, S. 下咽頭癌の新規がん幹細胞表面マーカーの同定:CD271. 第114回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、札幌市, 2013. 5
- ⑤ Imai, T. Mochizuki, M., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Ogama, N., Yokoyama, M., Matsuura, K., Saijo, S., Sugamura, K., Tanaka, N.: CD271 defines a stem cell population in hypopharyngeal cancer. 第72回日本癌

学会学術総会, 横浜, 2013. 9

- ⑥ 松浦一登:抗がん剤の有害事象対策第114回日本耳鼻咽喉科学会臨床セミナー. 2013. 5 札幌

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦一登 (MATSUURA, Kazuto)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号: 70271947

(2) 研究分担者

田中伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号: 60280872