

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593034

研究課題名(和文) 進行・再発・切除不能口腔癌に対する新規機能温存療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel functional preservation therapy against advanced, recurrent or unresectable oral cancers.

研究代表者

原田 耕志 (HARADA, Koji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60253217

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)：進行・再発・切除不能口腔癌に対する治療には困難を来す事が多く、新規治療戦略の開発が急務である。癌幹細胞を標的とした治療薬の開発が行われてきたが、腫瘍組織中から採取可能な癌幹細胞数には限りがあり、人工癌幹細胞の作製が望まれる。そこで本研究では、リプログラミング因子を舌癌細胞HSC2へ遺伝子導入することにより、癌幹細胞に類似したトランスフェクタント(HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL)を作製した。これを用いる事で癌幹細胞を標的とした薬剤スクリーニングや悪性度獲得メカニズムの解明が可能となり、進行・再発・切除不能口腔癌に対する新規機能温存療法の開発につながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is often difficult to treat advanced, recurrent or unresectable oral cancers. A new strategy must be needed. In these years, the cancer stem cells (CSCs) are an important target for the development of novel strategies in above oral cancer treatment. However, CSCs-targeted new anti-cancer drug discovery is currently hindered by the lack of easy and reliable methods for collecting sufficient number of CSCs. Briefly, artificially-manufactured cancer stem cells are essential. In this project, we could generate the transfectant cells (HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL) with CSCs properties by introduction of defined reprogramming factors (Oct3/4, sh53, Sox2, Klf4, l-Myc and Lin28) into HSC2 tongue cancer cells. Our findings suggest that artificial cancer stem cells developed by cellular reprogramming may be useful for investigating the acquisition of potential malignancy as well as screening the CSCs-targeting drugs.

研究分野：歯科口腔外科学

キーワード：人工癌幹細胞 リプログラミング因子 エピソーマルベクター 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療においては、生存率の向上が求められると同時に機能温存と審美性の保持が他の悪性腫瘍以上に要求されることから、化学・放射線療法の役割は非常に大きい。我々は、口腔癌患者に対してフッ化ピリミジン系経口抗癌剤(UFT)と放射線の併用療法を行いその有用性を報告し(Apoptosis 1997; 2: 227-238)、また TS-1 と放射線同時併用療法臨床第 相試験 (Gan To Kagaku Ryoho. 2006; 33 Suppl 1: 179-183) を行うなど、これまで口腔癌に対する機能温存療法の確立を目指してきた。しかしながら、上記治療法は何れも有用な治療効果予測因子の欠如のため奏効例、非奏効例の予測が困難であり、これらの治療法を選択する基準が未だ不明確である。なお放射線増感効果につながる化学療法剤の検討も行ってきたが、進行・再発・切除不能口腔癌患者の予後の劇的改善につながるような化学療法レジメンは見出せなかった(Oral Oncol 2004; 40; 713-719, Int J Oncol. 2004; 25; 905-911, Cancer Lett. 2005; 226; 161-168)。当科では3年程前から放射線治療部の協力により、横浜市立大学歯科口腔外科のレジメン[ドセタキセル(DOC) 15mg/m²、シスプラチン(CDDP) 5 mg/ m²、外部照射 2 Gy/day を週 1 回、CDDP 5 mg/ m²、外部照射 2 Gy/day を週 4 回、これを 6 週間継続する方法]に準じて、局所進行口腔癌に対する超選択的動注化学放射線療法を開始し、経過観察期間は短いものの手術を行うことなく局所制御に成功している。また、再発・転移の原因となる癌幹細胞が抗癌剤や放射線に抵抗性を示すことが報告され、転移巣に対する化学・放射線療法の有効性は期待出来ないと考えられているが、本治療法により治療前に認められた頸部リンパ節転移巣が、原発巣と共に制御されるケースを多数経験している。ただし、本治療法は劇的な治療効果の反面、顕著な粘膜炎・皮膚炎が生じ治療の完遂が困難となるだけでなく、治療後口腔乾燥や味覚障害が継続し QOL の低下につながるケースが見られており、更なる改良により、有用な治療戦略につながると期待されていた。

2. 研究の目的

癌幹細胞を標的とした新規化学療法レジメンを考案することにより、超選択的動注化

学放射線療法の治療効果の向上と副作用の軽減を図り、これまでにない新規機能温存療法の開発を本研究の最終目標とした。目標達成のために、まず口腔癌細胞へ Stemness の維持につながる遺伝子導入を行い、癌細胞の脱分化を誘導することによって、人工癌幹細胞(induced Cancer Stem Cell; iCSC)を樹立することを第一の目的とした。また、樹立した iCSC が癌幹細胞モデルとして利用可能か否か、薬剤スクリーニングに利用出来るか否かを検討することを第二の目的とした。さらに樹立した iCSC を用いた薬剤スクリーニングを行い、癌幹細胞に対する新規治療薬開発の可能性を探ることを第三の目的とした。

3. 研究の方法

(1) iCSC の樹立

OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクター(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の3種類)を Addgene (Cambridge, MA, USA) より購入し、遺伝子導入装置(Microporator)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)ならびに Neon Transfection System Kit (100 µL)(Invitrogen)を用いた電気穿孔法により、口腔癌細胞株(HSC2)へ上記ベクターを遺伝子導入することによって人工的に癌幹細胞の樹立を試みた。また遺伝子導入効率の評価には pCXLE-EGFP を利用した。

(2) トランスフェクタントの比較検討

各トランスフェクタントの iCSC としての可能性と悪性度獲得のメカニズムについて以下の方法にて検討した。

MTT assay による細胞増殖能、Migration assay (Boyden chamber; Neuro Probe, Inc., Chemotaxicell; クラボウ)による細胞移動能、Scratch assay による浸潤能、低付着性細胞培養プレート(Costar 3474; Corning)を用いた sphere 形成能、Western blot 法による癌幹細胞マーカーの発現、MTT assay による各種抗癌剤、分子標的薬、放射線に対する抵抗性、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能、次世代シーケンサーを用いた SAGE 法による特異的な発現変動を示す遺伝子の検索および IPA を用いたパスウェイ解析。

4. 研究成果

(1) トランスフェクタントの作製

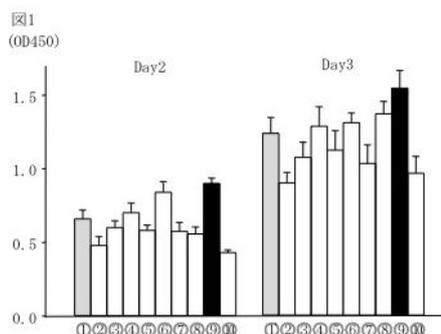
pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、

pCXLE-hUL の 3 種類のプラスミドベクターをそれぞれ、あるいは 2 つずつの組み合わせ、または 3 種類全てを HSC2 細胞へ電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行うことで 8 種類のトランスフェクタントを作製し、ampicillin を用いて stable clone を得た。なおベクターの導入効率を確認するために蛍光顕微鏡 (Floid; life tech.) 下に FGFP 陽性細胞を観察した所、HSC2 細胞に対する pCXLE-EGFP の導入効率は 1650V で約 50%、1550V で約 30% であった。さらに、HSC2 へ pCXLE-EGFP を単独で遺伝子導入を行い ampicillin にて stable clone を得たものと、HSC2 の parental cell をコントロールとして比較検討に用いた。なお 3 種類全てを HSC2 細胞へ導入する際には、1650V だけでなく 1550V でも電気穿孔法を行った。

- ① HSC2 parental
- ② HSC2/EGFP (1650V)
- ③ HSC2/hOCT3/4-shp53-F (1650V)
- ④ HSC2/hSK (1650V)
- ⑤ HSC2/hUL (1650V)
- ⑥ HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK (1650V)
- ⑦ HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hUL (1650V)
- ⑧ HSC2/hSK+hUL (1650V)
- ⑨ HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL (1650V)
- ⑩ HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL (1550V)

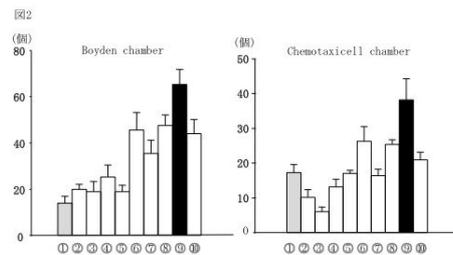
(2) トランスフェクタントの細胞増殖能の比較

MTT assay を行ったところ、各トランスフェクタント間で細胞増殖能に差異を認めた。すなわち、3 日目の細胞増殖能は、1650V で 3 種類すべてのプラスミドベクターを遺伝子導入した⑨が最も高く、EGFP のみ遺伝子導入した②や 1550V で 3 種類すべてのプラスミドベクターを遺伝子導入した⑩が低い細胞増殖能を示した(図 1)。



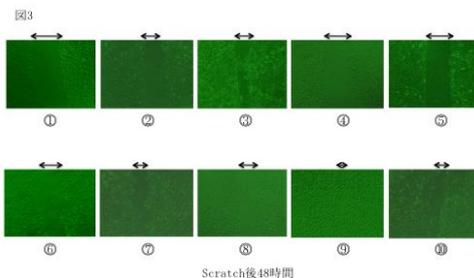
(3) トランスフェクタントの細胞移動能の比較

Migration assay を行ったところ、各トランスフェクタント間で細胞移動能に差異を認めた。すなわち 8 μm の穴を移動する能力は、Boyden chamber においても Chemotaxicell chamber においてもトランスフェクタントの⑨が最も高かった(図 2)。



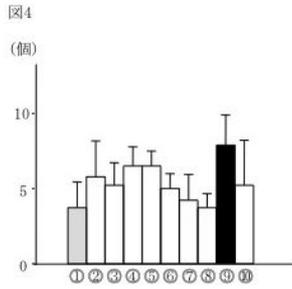
(4) トランスフェクタントの浸潤能の比較

Scratch assay を行ったところ、各トランスフェクタント間で浸潤能に差異を認めた。すなわち Scratch を行った後 48 時間の時点で、Scratch した部位へ最も多くの細胞が浸潤したのは⑨であり、③、⑦、⑩も他と比較して高い浸潤能を示した(図 3)。



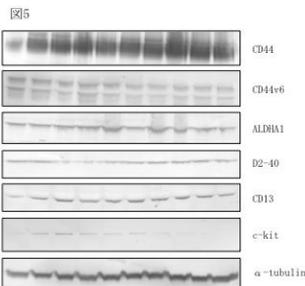
(5) トランスフェクタントの sphere 形成能の比較

低附着性細胞培養プレートを用いて培養を行ったところ、各トランスフェクタント間で sphere 形成能に差異を認めた。すなわち ⑨が最も sphere 形成能が高く、③が最も sphere 形成能が低かった(図 4)。



(6) トランスフェクタントの癌幹細胞マーカー発現の比較

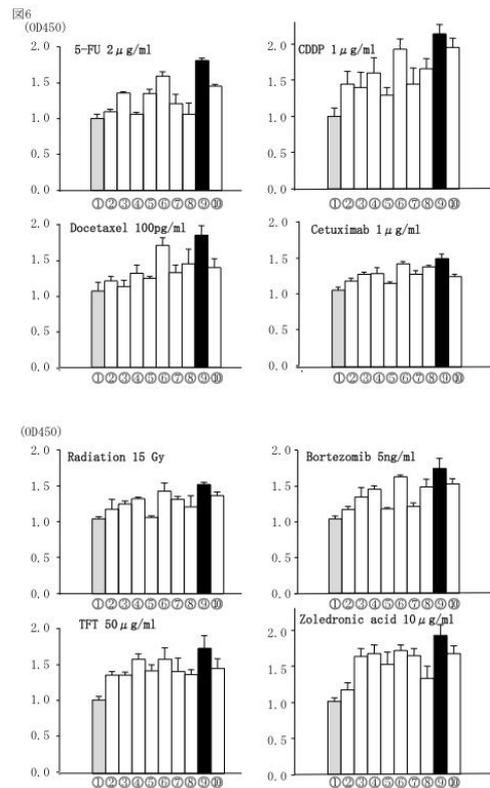
Western blot.法を用いて癌幹細胞マーカーの発現を検討したところ、各トランスフェクタント間で癌幹細胞マーカーの発現に顕著な差を認めなかった。すなわち頭頸部癌幹細胞マーカーである CD44 の発現は、親株と比較してすべてのトランスフェクタントにおいて顕著な発現増強を示したが、各トランスフェクタント間では大差はなかった。また CD44 のバリエーションアイソフォーム 6 (CD44v6) の発現は、親株も含めて各トランスフェクタント間で顕著な差は認められなかった。頭頸部癌だけでなく乳癌においても重要な癌幹細胞マーカーとされている ALDH1、リンパ管マーカーとしても知られる D2-40、新規肝臓癌幹細胞マーカーである CD13 の発現も、それぞれ各トランスフェクタント間では大差を認めなかった。なお幹細胞マーカーである c-kit は⑨、⑩においてその発現がほとんど認められなかった(図5)。



(7) トランスフェクタントの各種抗癌剤、分子標的薬、放射線に対する抵抗性の比較

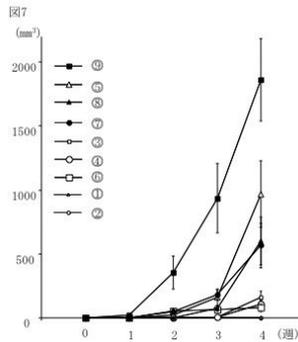
MTT assay を行ったところ、各トランスフェクタント間で各種抗癌剤、分子標的薬、放射線に対する抵抗性に差異を認めた。すなわち口腔癌治療に用いられている 5-FU、CDDP、

Docetaxel、Cetuximab すべてに対して⑨が最も抵抗性を示した。また⑥、⑩、⑧も上記薬剤に抵抗性を示した。なお親株と比較した場合、すべてのトランスフェクタントは程度の差はあるものの上記薬剤に抵抗性を示していた。同様に放射線に対しても⑨が最も抵抗性を示し、⑥、⑩も抵抗性を示した。現在口腔癌に適応がないプロテアソーム阻害剤 Bortezomib、ヌクレオシド系抗癌剤トリフルオロチミジン、ビスフォスフォネートである Zoledronic acid に対しても⑨が最も抵抗性を示し、⑥、⑩も抵抗性を示した(図6)。



(8) トランスフェクタントの免疫不全マウスにおける造腫瘍性の比較

親株とともに各トランスフェクタントのヌードマウス背部皮下における造腫瘍性を比較したところ差異が認められた。すなわち 10000 個の細胞を注射器にて背部皮下へ注入後 2 週間の時点で、⑨および⑥は小さな腫瘍を形成し、4 週間の時点で⑤、⑦、⑧では中等度の腫瘍を形成し、⑨では顕著な腫瘍を形成した(図7)。



(9) トランスフェクタントの悪性度を獲得するメカニズムの検討

次世代シーケンサーを用いた SAGE 法により、親株とトランスフェクタント間で発現変動の著しい遺伝子を検索し、IPA を用いて 99% 有意差のある遺伝子を対象にパスウェイ解析を行った結果、Cell cycle の経路が 1 位で認められ、Cyclin D1 が中心になっており、これを活性化制御している転写因子は ERG であり、FOXO1 や HRAS の強い関与が示唆された。これが増殖能の高さにつながっていると考えられた。第 2 位の経路では、TGF を介してインテグリンやコラーゲンの発現を変化させており、この際 CXCL の発現増強を認めた。これが走化性に関与し、浸潤能の高さにつながっていると考えられた。

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 4 件)

Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. Osteogenic cell fractions isolated from mouse tongue muscle. *Mol Med Rep*. 査読有り 2015 Jul;12(1):31-36. doi: 10.3892/mmr.2015.3350. Epub 2015 Feb 13.

Harada K, Ferdous T, Kobayashi H, Ueyama Y. Paclitaxel in combination with cetuximab exerts antitumor effect by suppressing NF- κ B activity in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 査読有り 2014 Dec;45(6):2439-2445. doi: 10.3892/ijo.2014.2655. Epub 2014 Sep 17.

Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. Establishment of 5-fluorouracil-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines with epithelial to mesenchymal transition changes. *Int J Oncol*. 査読有り 2014 Apr; 44

(4):1302-1308. doi: 10.3892/ijo.2014.2270. Epub 2014 Jan 21.

Ferdous T, Harada K, Kin T, Harada T, Ueyama Y. Efficacy of schedule-dependent metronomic S-1 chemotherapy in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 査読有り 2013 Jul;43(1):271-279. doi: 10.3892/ijo.2013.1950. Epub 2013 May 20.

[学会発表](計 20 件)

原田 耕志 他、ヒト唾液腺癌における PD-L1 の発現、第 69 回日本口腔科学会学術集会、2015 年 5 月 14 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

原田 耕志 他、リプログラミング因子導入による癌細胞の脱分化、第 62 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会、2014 年 10 月 25 日、徳島大学歯学部大講義室(徳島県・徳島市)

原田 耕志 他、口腔扁平上皮癌における RTP3 発現の Docetaxel 耐性ならびに予後への関与、第 13 回中四国口腔癌研究会 学術講演会、2014 年 10 月 24 日、ホテルグランドパレス徳島(徳島県・徳島市)

Harada K, et al. Establishment of Induced Cancer Stem Cells by Transfection of a Tongue Cancer Cell Line with Yamanaka's Factor. The EACMFS, 23-26 September 2014, Prague Congress Center, Prague (Czech republic)

Ferdous T, et al. Identification of docetaxel-resistance related genes in oral squamous cell carcinoma. The 96th AAOMS, 8-13 September 2014, Hawaii Convention Center, Honolulu (U.S.A.)

原田 耕志 他、化学放射線療法による口内炎に対する成分栄養剤エレンタール®の効果、第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

原田 耕志 他、化学放射線療法による口内炎に対する成分栄養剤エレンタール®の効果、第 11 回日本口腔ケア学会総会・学術大会、2014 年 6 月 28~29 日、旭川市民文化会館(北海道・旭川市)

原田 耕志 他、口腔扁平上皮癌における CCKBR 発現の 5-FU 耐性ならびに予後不良への関与、第 38 回日本頭頸部癌学会、2014 年 6 月 13 日東京ファッションタウンビル(東京都・江東区)

竹縄 隆徳 他、口腔扁平上皮癌細胞株を用いた Cetuximab の Paclitaxel 増強効果に関する基礎的検討、第 69 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 8~9 日、京王プラザホテル（東京都・新宿区）

白石 瑠里子 他、進行・再発口腔扁平上皮癌に対する Cetuximab と Paclitaxel 併用療法の検討、第 43 回日本口腔外科学会 中国四国支部学術集会、2014 年 4 月 26 日、徳島大学 長井記念ホール（徳島県・徳島市）

Harada K, et al Establishment of 5-fluorouracil-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines and their cancer stem cell like characteristics. 21ST ICOMS, 21-24 October 2013, Barcelona, Spain.

原田 耕志 他、口腔白板症の癌化における NF- B を介した M2 マクロファージの関与、第 17 回日本がん免疫学会総会、2013 年 7 月 4-5 日、ANA クラウンプラザホテル宇部（山口県・宇部市）

原田 耕志 他、口腔白板症の癌化における転写因子 STAT3 を介した M2 マクロファージの関与、第 37 回日本頭頸部癌学会、2013 年 6 月 13 日、京王プラザホテル（東京都・新宿区）

中村 健吾 他、シスプラチンを含む化学療法を受ける口腔扁平上皮癌患者に対するアプレピタント、ホスアプレピタントメグルミンの制吐効果の比較検討、第 42 回日本口腔外科学会 中国四国支部学術集会、2013 年 4 月 27 日、隠岐島文化会館（島根県・隠岐郡）

原田 耕志 他、口腔扁平上皮癌に対する Docetaxel と TS-1 併用術前化学療法の効果予測、第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2013 年 1 月 24 日、秋葉原コンベンションホール（東京都・千代田区）

Harada K, et al. Antitumor effect of S-1 in combination with Cetuximab on human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. 10th ACOMS, 15-18 November 2012, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali (Indonesia)

Harada T, et al. Therapeutic efficacy of Granulocyte colony stimulating factor on the 5-FU-induced mouse dermatitis. 10th ACOMS, 15-18 November 2012, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali (Indonesia)

中村 健吾 他、TPF 療法が施行された進行口腔扁平上皮癌患者における癌幹細胞マ

ーカーの発現と治療効果、第 62 回日本口腔科学会総会・学術大会、2012 年 10 月 20 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県・横浜市）

原田 豊子 他、5-FU 誘発マウス皮膚炎に対する顆粒球コロニー刺激因子の治療効果、2012 年 6 月 8 日、島根県民会館（島根県・松江市）

原田 耕志 他、口腔扁平上皮癌における分子標的薬 Cetuximab の TS-1 増強効果、第 36 回日本頭頸部癌学会、2012 年 6 月 7 日、島根県民会館（島根県・松江市）

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 耕志 (HARADA, Koji)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60253217

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし