

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792264

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞モデル細胞株の樹立とがん幹細胞を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of oral cancer stem-like cells using normal human tongue keratinocytes

研究代表者

頭司 雄介 (Zushi, Yusuke)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：80581206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん幹細胞の発現・維持機構の解析可能なモデルの作成は重要な課題であるが、これまでの報告の多くは、がん細胞株あるいはマウスを使用した実験系であった。本研究において、申請者らはヒト正常舌角化細胞にレトロウイルスを用いてCDK4, Cyclin D1, hTERT, Hras, cMyc、ドミナントネガティブp53を遺伝子導入することにより、臓器特異的ながん幹細胞株を樹立することに成功した。あわせて口腔がん幹細胞の成立・維持機構の解析と共に、マイクロアレイ解析などによりCD44, Bmi-1, ALDH1などが口腔がん幹細胞マーカーとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We newly established human tongue keratinocytes (HTK) cell lines derived from tongue mucosa with retroviral vectors expressing mutant CDK4, cyclinD1, hTERT and dominant negative form of p53. Additional transduction of oncogenic Hras or EGFR together with c-Myc into the HTK-K4DT-DNp53 showed subcutaneous tumor formation in nude mice only around 2 weeks. To determine the frequency of oral cancer initiating cells within these cells, a limiting dilution assay was performed. Orthotopic transplantation of HTK-K4DT-DNp53-Hras-cMyc resulted in local growth of tumors in all the mice tested and some of them yielded regional metastases in 2-3 weeks. We have established an in vitro model for OSCCs with normal human tongue keratinocytes (HTKs) focusing on sequential transduction of defined genetic elements and succeeded in the creation of highly potent cancer initiating cells by introduction of c-MYC and oncogenic Hras on a background of the blockade of the pRB and p53 pathways.

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：ヒト正常舌角化細胞 口腔がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がん研究振興財団の統計によると、口腔・咽頭がんの罹患者は 2003 年ですでに年間 11000 人を超え、増加傾向にある。口腔がんの治療は、超選択的動注化学療法を併用した放射線治療や即時再建術の進歩により、局所制御率は飛躍的に向上したものの、治療成績は必ずしも満足しうるものではない。その主たる要因は抗がん治療によっても残存し治療抵抗性を示す悪性度の高いがん細胞による再発および転移の制御不能によると考えられる。これまでの抗がん治療法は、頭頸部領域においても、がんを均一の細胞集団とみなし増殖するがん細胞を死滅させることを目的として開発されてきている。しかし、最近の研究でがん幹細胞の存在が示されて以来、がん幹細胞は抗がん治療に対して抵抗性が高く、大多数のがん細胞を治療で除去しても、がん幹細胞が残存しているために再発する可能性が高いと考えられている。また、一部の治療法によっては、がん幹細胞が治療に抵抗して残存するばかりでなく、さらに変異を蓄積し、より悪性度の高いがん幹細胞として再発に関与している可能性が示唆されている (Nature 2006;442(7104):742-3 Nature 2011;469(7330):314-22)。多くの培養がん細胞株中に含まれるがん幹細胞様細胞は数%以下であると報告されている。そこで、培養維持可能ながん幹細胞を実験的に作成し、その細胞を用いて、がん幹細胞を標的とした治療法を開発する必要性は極めて高いといえる。このような試みは活発に行われつつあるが、多くが、がん細胞株あるいはマウスを使用した実験系である。ヒト正常舌角化細胞を基にした試みの報告はなく独創的かつ、ヒトの口腔がんを考える上で必須の実験であると考えられる。また、がん幹細胞の出現・維持機構を解明することは、がん幹細胞を標的とした治療における分子標的を明らかにすることに繋がる重要な課題である。

2. 研究の目的

これまでの実験で同意を得た患者より採取したヒト正常舌角化細胞 HTK (Human Tongue Keratinocytes) にレトロウイルスを用いて CDK4, CyclinD1, hTERT を導入し、不死化を試みた。HTK-CDK4/cyclinD1/hTERT 細胞株に口腔がんへの関与が示唆されるがん遺伝子を追加導入することにより、造腫瘍性のある細胞株の樹立に成功し、口腔がんの in vitro 多段階発がんモデルを確立した (Am J Cancer Res 1(7):869-881, 2011)。このモデルを用いて口腔がん幹細胞の成立・維持機構の解析をすすめ、がん幹細胞を標的とした治療法を開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 試薬

本研究で用いた試薬で特に記載のないものは Sigma 社および Invitrogen 社、和光純薬、ナカライテスクの試薬を用いた。

(2) 細胞培養

同意を得た飲酒・喫煙・がんの既往歴のない舌嚢胞の患者 2 名の手術検体から、以下の方法でヒト正常舌角化細胞 Human tongue keratinocyte (HTK) を兵庫医科大学病院、歯科口腔外科にて分離培養した。(HTK1 は 65 歳、女性・HTK3 は 58 歳女性よりそれぞれ採取した。)

正常舌粘膜を 1mm 角にカットし、BIOCOAT collagen 1coated dish 上に約 10mm 間隔で貼り付け、少し乾燥するまで放置後、抗生剤(カルベニン 2 μ g/ml、アムフォテリシン B 1 μ g/ml) を添加した培地を加え、explant 法で静置した。HTK1, HTK3 にレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを用い、以下の不死化細胞株を樹立した。HTK1-CDK4/cyclinD1/hTERT(以下 HTK1K4DT), HTK3-CDK4/cyclinD1/hTERT(以下 HTK3K4DT)。各細胞株は EpiLife(Cascade Biologics 社, 500 ml にウシ下垂体抽出物(BPE) 20mg と EGF 0.1 μ g を添加)で培養した。細胞の培養はすべて 5%CO₂、37 条件下で行った。がん関連遺伝子の追加導入にもレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを用いた。導入した遺伝子の発現確認は Western Blot, TRAP assay にて行った。

(3) 遺伝子安定発現細胞の作製

各 cDNA (cyclin D1, cdk4R24C, hTERT, DNp53, erbB1, erbB1d746-750, H-RasV12, c-MycT58A, Nrf2T80K, Emerald-luciferase) は Gateway System(Invitrogen 社)を用いてエンタリーベクターに BP 反応により組換えした後、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター プラスミドに LR 反応により組換え導入した。BP 反応、LR 反応はそれぞれ添付書類の指示に従った。各エンタリークローンについてシーケンス解析により塩基配列が正しいことを確認した。それぞれの発現コンストラクトと packaging plasmid mixture を 293T 細胞に遺伝子導入し、60 時間後に培養液中の組換えレトロウイルスまたはレンチウイルスを回収した。薬剤耐性マーカーをもつレトロウイルスは HeLa 細胞で力価を測定した。レンチウイルスの力価は定量 RT-PCR 法により推定した。ウイルス感染にはポリブレン 6 μ g/ml 存在下で MOI (multiplicity of infection) =1-3 にて行った。

(4) ウェスタンブロッティング

細胞を PBS で 2 回洗浄後、lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 20% Glycerol, 0.1% SDS) を用いて回収した。ソニケーション後遠心分離し上清を細胞溶解液とした。蛋白定量後 5% 2-メルカプトエタノールを加え、それぞれ

10-15 µg/lane をウエスタンブロッティングに供与した。分子量マーカーは Precision Protein Standards (Bio-Rad) を用いた。アクリルアミド濃度 5-20%の蛋白泳動用既製ゲル(アトー株式会社)で電気泳動を行い、ゲル中の蛋白質を3種の転写緩衝液(A:300mM Tris, 20% Methanol, B:25mM Tris-HCl, 20% Methanol, 0.05% SDS, C:25mM Tris-HCl, 40mM アミノカプロン酸, 20% Methanol, 0.05% SDS)をもちいて、Immobilon PVDF 膜 (MILLIPORE) に、セミドライ式のブロッティング装置(アトー株式会社)を用いて転写した。転写後の膜を 5%スキムミルク/TBST (0.05% Tween/TBS, 10mM Tris-HCL(pH 8.0), 150mM NaCl) で室温にて 30 分ブロッキングした後に TBST で洗浄した。その後、それぞれの蛋白に対する一次抗体を 4 で一晩反応させた。二次抗体として HRP 結合抗 IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories;1:2000) を室温で 1 時間反応させた。蛋白質の検出には Lumi-Light plus Western Blotting Substrate を用いた化学発光法を行った。その後、LAS-3000 (富士フイルム社)を用いて検出した。

(5)細胞増殖曲線

12well plate に細胞を triplicate で 8000 個ずつ播種し、1,4,7,10 日目に細胞数をカウントした。

(6)軟寒天培地における形成能

培養用 seaplaque agarose 2%溶液 (2% SPA) を電子レンジで溶かした後、約 40 に加温した完全培地(KSFM)と混合し SPA 濃度を調整した。直径 35 mm の dish (6 well plate)に 0.7% SPA/完全培地混合溶液を 1 well 当り 1.5 ml 入れて室温で固形化した後、細胞 5×10^4 個を 0.4%SPA/完全培地混合溶液 1 ml 中に浮遊させ積層した。翌日 1.5 ml の 0.7%SPA/KSFM 混合溶液を積層し、4 週間後のコロニー数をカウントした。

(7)ヌードマウス皮下移植

5 週齢のバルブ C ヌードマウス、メスの皮下に 2×10^7 個/ml の PBS 細胞浮遊液と Matrigel (BD Biosciences) を 1:1 で混合した溶液を 0.1ml (1×10^6 個)ずつ 4 箇所に移植した。

(8)ヌードマウス舌同所性移植、IVISystem(In Vivo Imaging System)

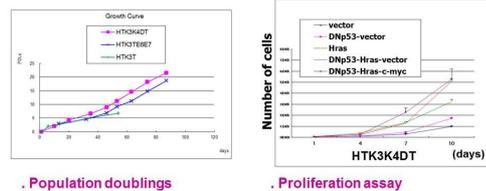
5 週齢のバルブ C ヌードマウス、メスの舌に細胞 1×10^5 個を PBS で懸濁し、50 µl ずつ移植した。

4. 研究成果

(1) 親株であるヒト正常舌角化細胞 HTK は継代数 5 で増殖停止したが、HTK1K4DT, HTK3K4DT は継代数 20 代を越えても正常基底細胞と同様の形態を維持しながら増殖し続けた(Fig. 1)。PD(population doubling)100 でもほぼ

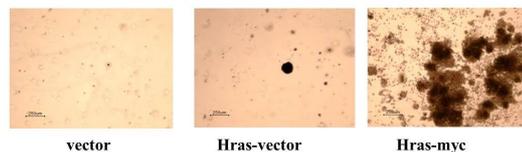
正常な染色体像、分化能を示した。HTK3K4DT の平皿上の細胞増殖曲線では、Hras 単独追加導入でも増殖速度の亢進をみとめ Hras と cMyc を導入した細胞では更に増殖速度が亢進していた。

Fig.1 HTK3細胞の不死化 (population doublings). HTK3K4DTに dominant negative p53(DNp53), Hras, c-myc 遺伝子を導入した細胞の増殖曲線 (proliferation assay).



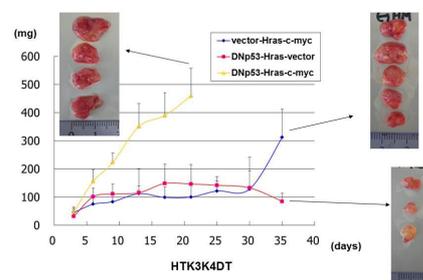
(2) 軟寒天培地中では HTK3K4DT-DNp53 細胞に vector のみ導入の細胞は足場非依存性の増殖能はみとめなかったが、Hras 単独追加導入で増殖能を示し、Hras + cMyc で著しい増殖能の亢進を認めた (Fig. 2)。

Fig. 2 HTK3K4DTに dominant negative p53(DNp53), Hras, c-myc 遺伝子を導入した細胞の軟寒天培地におけるコロニー形成能 (Soft agar colony assay).



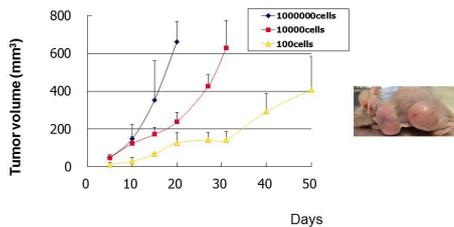
(3) 次いで HTK3K4DT に DNp53, Hras, cMyc が関連遺伝子を導入し樹立した細胞のヌードマウスの皮下移植による造腫瘍能を検討した(Figure. 3)。HTK3K4DT のヌードマウス皮下移植では DNp53 と Hras と cMyc の導入で 2 週で 100%に腫瘍形成を認めた。Hras と cMyc の導入だけでも造腫瘍性を獲得したが、5 週で 100%に腫瘍形成を認めた。DNp53 は間接的に造腫瘍性獲得に大きく関与している可能性が考えられた。

Fig. 3 HTK3K4DTに DNp53, Hras, c-myc 遺伝子を導入した細胞をヌードマウスの皮下移植による造腫瘍能の解析.



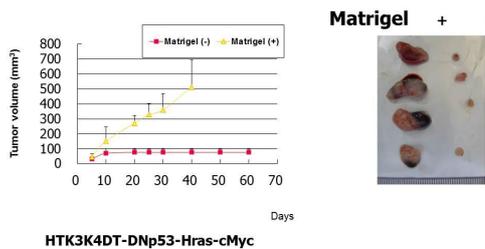
(4) 前述のヌードマウス皮下で造腫瘍性を獲得した細胞で limiting dilution assay により 10000 個、100 個の皮下移植でも腫瘍を形成するかを検討した (Fig. 4)。100 個の皮下移植でも腫瘍を形成した群は、がん幹細胞様細胞を高率に含む細胞集団であると捉えている。またそれらの細胞においてウェスタンブロットングにて分化マーカーである involucrin の発現が有意に低下していた (Data not shown)。

Fig.4 HTK3K4DTにDNp53, Hras, c-myc 遺伝子を導入した細胞を limiting dilution assay により細胞数を減らして、ヌードマウスの皮下に移植し、造腫瘍能を検討した。



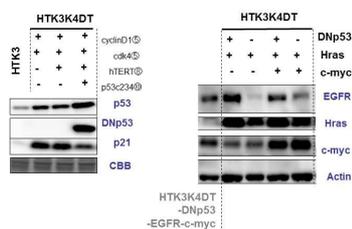
(5) 上記の細胞で matrigel の有無による造腫瘍能獲得について検討した (Fig. 5)。matrigel のない場合、造腫瘍性は著しく低下することが示唆され、matrigel ががん幹細胞の微小環境 niche を提供していることが示唆された。

Fig.5 HTK3K4DTにDNp53, Hras, c-myc 遺伝子を導入した細胞をヌードマウスの皮下に移植、matrigelの有無で造腫瘍能の比較検討。



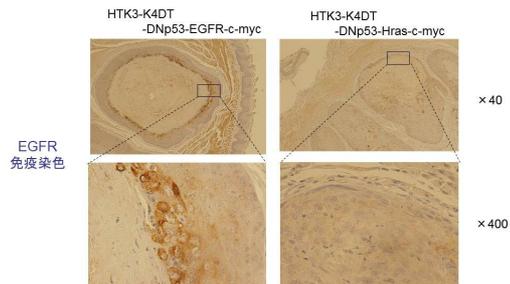
(6) 上記の細胞においてウェスタンブロットングにて口腔発がんの責任遺伝子である EGFR 発現が p53 の不活化に依存して増幅されていた (Fig. 6)。

Fig. 6 HTK3-K4DTにDNp53, Hras, c-myc を導入した細胞の遺伝子発現をウェスタンブロットングで確認した。



(7) 次に HTK3K4DT に DNp53, Hras, cMyc を導入した、ヌードマウス皮下移植で著しい造腫瘍性を獲得した細胞を舌に同所性移植したところ、n=4 匹中 3 匹、早いもので 2 週間程度腫瘍を形成した。2 週間ごとに IVIS システムを用い発光強度より腫瘍体積増加を推定した。屠殺の際に顎下リンパ節、肺、肝臓を調べたところ、リンパ節に転移を認めた (n=4 中 2 匹)。免疫染色にて舌腫瘍における EGFR, p53 の発現を確認した (Fig. 7)。

Fig. 7 HTK3K4DTにDNp53, EGFRもしくはHras, c-myc 遺伝子を導入した細胞をヌードマウスの舌に移植、形成した腫瘍をEGFR免疫染色した。



(8) 追加で、この口腔がん幹細胞モデルと口腔がん細胞株 (HSC-2,3, OSC-19) および臨床検体の遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR 解析で比較検討し、CD44, Bmi-1, ALDH1 などが口腔がん幹細胞マーカーとなりうることを示唆された。

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)

野口一馬, 寺田友紀, 中野芳郎, 山村倫世, 吉川恭平, 頭司雄介, 森寺邦康, 高岡一樹, 浦出雅裕, 岸本裕充 口腔扁平上皮癌の発生における Human papillomavirus (HPV) 感染の関与と診断法の検討日本口腔感染症学会雑誌 2013. 12 vol.20 No.2 70-76 ISSN 1346-9150 査読有

Takaoka K, Zushi Y, Noguchi K, Urade M et al :Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a CXC chemokine receptor-4 antagonist on tumor growth and metastasis in a xenotransplanted mouse model of adenoid cystic carcinoma of the oral floor. Int J Oncol 43(3):737-45, 2013 DOI 10.3892/ijo.2013.2011 査読有

Yamamura M, Noguchi K, Zushi Y, Urade M et al :Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells. Int J Oncol 42(3):873-80, 2013 DOI 10.3892/ijo.2013.1761 査読有

頭司雄介, 野口一馬, 浦出雅裕 HPV 陽性および陰性の口腔扁平上皮がんに対する in vitro 多段階発がんモデル 日本口腔外科学会雑誌 2013.3 vol.59 No.3 13-25 ISSN 0021-5163 査読有

[学会発表](計 8 件)

野口一馬, 頭司雄介, 吉川恭平, 山村倫世, 吉岡濟, 浦出雅裕, 岸本裕充. in vitro 発癌モデルを用いた口腔発癌におけるドライバー変異の解明. 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会 2013.11.23 東京

野口一馬, 頭司雄介, 吉川恭平, 山村倫世, 吉岡濟, 浦出雅裕, 岸本裕充. 組織培養を用いた口腔癌研究の最前線 - 発がんから医療への応用 -. 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会 2013.11.23 東京

Zushi Y, Noguchi K, Yamamura M, Moridera K, Takaoka K, Okui S, Urade M, Kishimoto H. Establishment of oral cancer stem-like cells using normal human tongue keratinocytes. 54th Congress of the Korean Association of Oral Maxillofacial Surgery (KAOMS2013) 2013.4.26 Daegu, South Korea

野口一馬, 藤井碧, 頭司雄介, 山村倫世, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞の細胞株の樹立と病態モデル作成の試み. 第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会 2012.11.24 広島

野口一馬, 吉川恭平, 瀬川英美, 川邊睦記, 頭司雄介, 山村倫世, 奥井森, 森寺邦康, 高岡一樹, 岸本裕充, 浦出雅裕. 当科における口腔扁平上皮癌の臨床的検討-RADPLAT 導入前後の比較-. 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2012.10.19 横浜

野口一馬, 藤井碧, 頭司雄介, 山村倫世, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 病態モデル作成を目指した角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞の不死化の試みと細胞株の樹立. 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2012.10.19 横浜

Zushi Y, Noguchi K, Yoshikawa K, Okui S, Takaoka K, Moridera K, Kishimoto H, Urade M. Analysis of carcinogenesis for both HPV-positive and -negative oral squamous cell carcinoma using

normal human tongue keratinocytes. 21th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMFS 2012) 2012. 9 .12 Dubrovnik, Croatia

頭司雄介, 野口一馬, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 口腔発がんにおける p53, EGFR, Ras 遺伝子発現の関連性について ~ 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK)を用いた解析~. 第 66 回日本口腔科学会総会 2012. 5.18 広島

6 . 研究組織

(1)研究代表者

頭司 雄介 (Zushi Yusuke)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：80581206