

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890173

研究課題名(和文) 幹細胞関連分子ヌクレオステミンの口腔扁平上皮癌における機能解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the function of nucleostemin in oral squamous cell carcinoma and develop the new therapeutic approach

研究代表者

吉田 遼司 (YOSHIDA, Ryoji)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10632458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、Nucleosteminが口腔扁平上皮癌(OSCC)の悪性形質、臨床的意義、新規治療法の開発に及ぼす影響について検討した。NSがOSCCの増殖能、浸潤能に及ぼす影響を過剰発現または発現抑制したOSCC細胞で検討した。患者の組織サンプルを用いてNSの発現を検討した。結果、NSの発現量はOSCCの増殖能や浸潤能と関連性を示した。また、その現象にSTAT3が関わっていることが判明した。一方、NSの発現量はOSCC患者の進行度と関連性を示し、かつNSの高発現は有意にOSCC患者の予後不良と関連していることが明らかとなった。NSが高悪性度OSCCの治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore the impact of Nucleostemin (NS) on malignancy, its clinical significance in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients and develop new therapeutic approach. We investigated the effects of NS on the proliferation and invasion of OSCC using NS-overexpressing or -knockdown OSCC cells. An immunohistochemical analysis of NS was performed in OSCC patients. The expression status of NS significantly correlated to the malignant phenotypes of OSCC cells. The alterations of these malignant phenotypes were associated with the activation of STAT3 signaling and its downstream targets. An immunohistochemical analysis demonstrated that a high NS tumor expression level significantly correlated with an advanced T-stage and nodal status. Furthermore, a Cox regression analysis revealed that the NS status was a significant progression factor for OSCC patients. Our results suggest that targeting NS may provide a promising treatment for highly malignant OSCC.

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：口腔癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌は頭頸部癌の約 60% を占める疾患であり、その 80% 以上を OSCC が占めている。近年、OSCC の診断・治療法の選択肢は広がっているものの、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない。その原因として、腫瘍組織中に抗癌剤や放射線耐性、あるいは高浸潤・転移能をもつ腫瘍細胞が存在していることが挙げられる。近年、そのような治療抵抗性、高悪性を示す腫瘍細胞は癌幹細胞と定義され、種々の腫瘍細胞においてその存在が確認されている。OSCC における癌幹細胞の生物学的特徴の理解やその維持機構の解明は新たな OSCC の診断法や治療法の開発に重要であると考えられる。

(2) NS は、ラットの神経幹細胞で最初に発見された新規核小体タンパク質である。これまでに、乳癌や脳腫瘍においてその癌幹細胞分画維持に重要な分子であることも報告されている。発見の経緯も含め、NS は腫瘍細胞および癌幹細胞の生物学的特徴の維持において非常に重要な機能を果たしていると考えられるが、OSCC における機能や臨床的意義については未だ謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究では、OSCC の病態解明および OSCC 癌幹細胞を標的とした新たな診断・治療法の開発を目的として、OSCC の発生・進展における NS の機能解析を行うことを目的とした。本研究は、OSCC の研究向上に寄与するだけでなく、他の腫瘍における癌幹細胞の制御機構解明にも新たな知見をもたらし、その治療法開発に貢献するものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) OSCC における NS の発現とその臨床的意義の解析

① OSCC における NS 発現量の解析

正常組織、OSCC (CIS、浸潤癌の原発巣、転移巣) での NS 発現様式を免疫組織化学染色、ウェスタンブロット法、リアルタイム PCR 法にて解析した。さらに、その結果と各種臨床情報との関連を統計学的に検討した。

(2) NS の発現変動が OSCC の進展に及ぼす影響とその分子機構の解析

NS タンパク質量の低下が OSCC の進展に寄与していることが示唆されるため、NS の発現抑制および過剰発現によって起こる現象を *in vivo*、*in vitro* で解析した。

① NS の強制発現による解析 (*in vitro*)

NS 応答性に GFP を発現するレトロウイルスベクターによる強制発現系を用い、GFP でモニター可能な NS の安定的強制発現を行った。*in vitro* の実験はマトリゲルインベージョンチャンバーによる浸潤能の評価、wound healing assay による遊走能の評価、MTS assay による増殖能の評価を行った。また、表現系の変化から重要と考えられる細胞内外関連因子の発現変化をタンパク質 (ウェス

タンブロット法、免疫染色)・遺伝子 (リアルタイム PCR 法など) レベル両面で解析した。

② NS の強制発現による解析 (*in vivo*)

SCID マウスに、樹立した NS 強制発現株およびコントロール株を移植し、まず増殖能や転移能の差異を評価した。これらに並行して、*in vitro* で数種類の OSCC 細胞株 (SAS、OSC-20) を用いて、NS の安定的強制発現で同様の現象が得られるかどうか、すなわち普遍性を持った現象であるかどうかを確認した。

(3) NS の発現制御メカニズムに関する検討
癌の進展に関わる環境条件や各種因子の NS の発現に与える影響を解析した。NS の発現制御機構の解明は、その後の現実的な診断・治療法の開発に貢献すると考えられる。

① 低酸素や低栄養によって NS 発現が調節されるか否かを *in vitro* で解析する。*in vitro* では特殊なインキュベータを用い、低酸素環境下で OSCC 細胞の生存や血管内皮細胞の動態などと NS との関連を解析した。

② 各種癌進展に関わる因子による NS 発現変化を検討する。TGF- β 、TNF- α などの EMT 誘導因子や各種炎症性サイトカインによる発現変化をリアルタイム PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

本研究において、NS が口腔扁平上皮癌 (OSCC) の悪性形質、臨床的意義、新規治療法の開発に及ぼす影響について検討した。

【NS の発現変動が OSCC の進展に及ぼす影響とその分子機構の解明】

NS 応答性に GFP を発現するレトロウイルスベクターによる強制発現系を用い、NS 安定強制発現 OSCC 細胞株を複数樹立した (下図)。

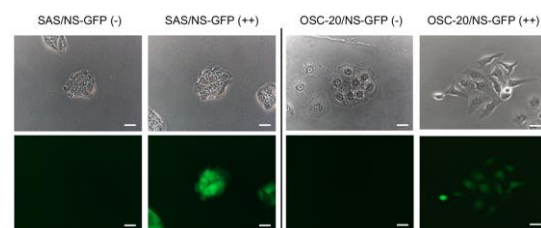


図 1: NS 高発現 OSCC 細胞株

同細胞株を用いた *in vitro* の実験から、NS 高発現 OSCC 細胞株が親株に比べて有為が高い増殖能や浸潤能を示すことを見出した。

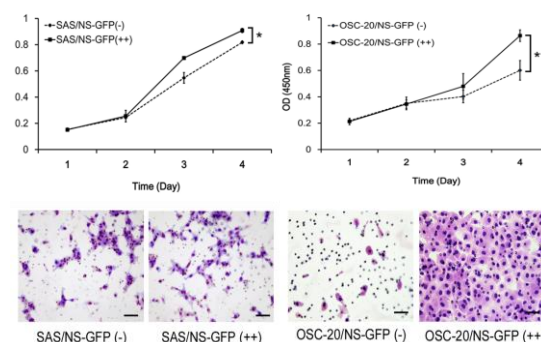
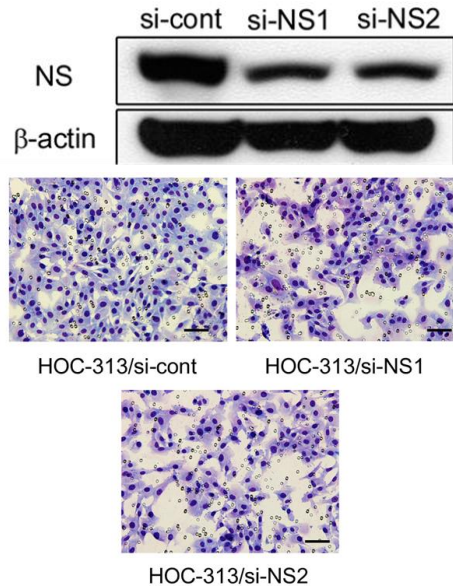
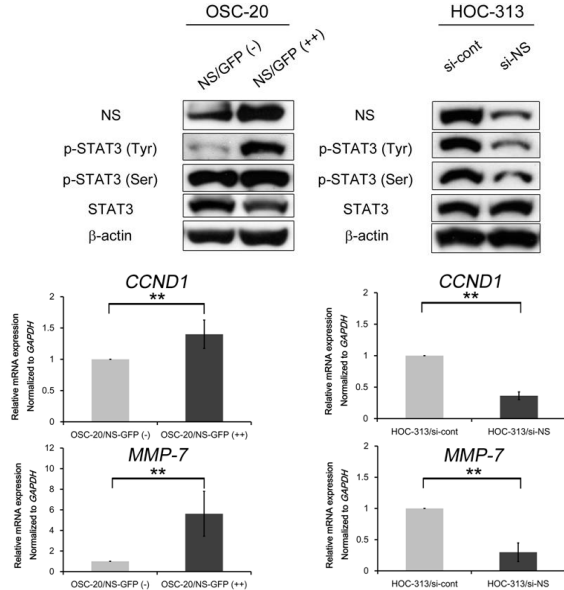


図1: NS 発現量と増殖能・浸潤能の関係
 過剰発現系によって得られた実験結果は複数の細胞株を用いて得られており、NS の高発現が癌細胞の悪性形質に影響を与えていることは OSCC 細胞株においてある程度共通していることが分かった。この結果に更に普遍性を持たせることを目的に、siRNA を用いて NS 発現を抑制した OSCC 細胞株を用いて検証した。その結果、下図に示すように NS 発現を抑制すると高浸潤性 OSCC 細胞株 HOC-313 の浸潤能が顕著に抑制されることが分かっ



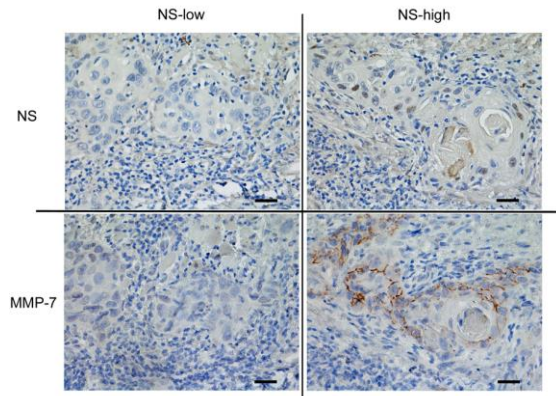
た。
 図2: NS 発現抑制における浸潤能変化

また、その表現型の変化に関わる分子を検索した結果、STAT3 のリン酸化に関わっている可能性が示唆された。また、STAT3 シグナル伝達経路の代表的下流分子である CCND1 や MMP-7 といった細胞の増殖や浸潤に関与する分子の発現変動が NS の発現量とよく相関することが判明した。このことから、NS が STAT3 のリン酸化を介して OSCC の悪性形質を制御



していることが示された (下図)。

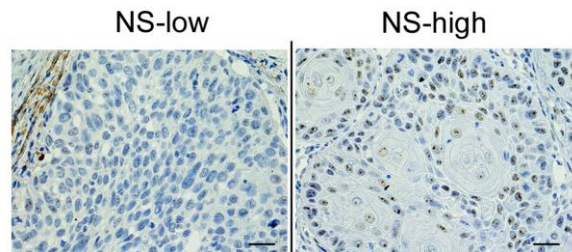
図3: NS 下流分子の発現変動
 特に、MMP-7 においては NS と MMP-7 の発現量はよく相関しており、実際の腫瘍においても試験管内実験のような現象が起こっている



可能性が示唆された (下図)。

図4: NS と MMP-7 の発現相関

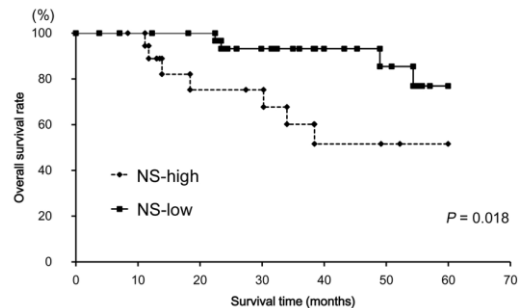
一方、OSCC 臨床検体における解析では、NS の発現量は患者によって大きく異なること



が分かった (下図)。

図5: OSCC 患者検体における NS 発現

また、統計学的解析により、NS 発現量が腫瘍の大きさやリンパ節転移の有無と相関することを見出した。また、NS 高発現 OSCC 患者は有意に5年全生存率が低下することが判



明した (下図)。

図6: NS 発現量別の5年生存率

更に、NS の高発現は OSCC 患者における独立した予後因子であることが明らかとなった (次ページ表1)。

Table 2. The results of a multivariate regression analysis for predicting the overall survival of 54 OSCC patients				
Variables	Assigned score	Hazard ratio	95% CI	P-value
T-stage				
T1, T2	1	0.55	-1.06 - 0.73	0.656
T3	2			
T4	3			
N-stage				
N0	0	0.46	-1.39 - 0.96	0.656
N1	1			
N2b	2			
N2c	3			
Clinical stage				
II	1	0.47	-2.57 - 0.84	0.363
III	2			
IV	3			
Differentiation				
Well	0	0.68	-1.87 - 0.89	0.562
Moderate	1			
Pathological response				
Grades 0, I, IIa	1	0.73	-0.91 - 0.28	0.295
Grade IIb	2			
Grade III	3			
Grade IV	4			
Nucleostemin status				
Low expression	0	9.09	0.78 - 3.83	0.002*
High expression	1			

Abbreviations: CI=confidence interval *, P < 0.05

表 1: 多変量解析結果

以上の研究成果より、NS が高悪性度 OSCC の治療標的となる可能性が示唆された。

加えて、低栄養、低酸素などの腫瘍周囲環境やサイトカインが NS の発現変動に影響を与えるかについて検討を行い、低酸素や炎症性サイトカイン、特に IL-6 が発現変動に関わる可能性を見出した。

最後に、マウス移植モデルを用いて樹立した NS 高発現 OSCC 細胞の生物学的挙動を探索し、腫瘍径に若干の差を認めた。今後、転移様相について更に解析を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①発表者: Ryoji Yoshida, Hideki Nakayama, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Takuya Tanaka, Kenta Kawahara, Yoshihiro Nakagawa, Yoshihiro Yoshitake, Kazutoshi Ota, Akimitsu Hiraki, Takaaki Ito, Masanori Shinohara

発表標題: The possible impacts of nucleostemin on cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma

発表学会名: 第 71 回日本癌学会学術総会

発表年月日: 平成 24 年 9 月 20 日

発表場所: ロイトン札幌、北海道

②発表者: 吉田 遼司、中山秀樹、永田将士、田中拓也、川原健太、中川純泰、廣末晃之、吉武義泰、太田和俊、平木昭光、伊藤隆明、篠原正徳

発表標題: 舌扁平上皮癌における核小体蛋白質 Nucleostemin の発現と機能

発表学会: 第 37 回頭頸部癌学会

発表年月日: 平成 24 年 6 月 7 日

発表場所: 島根県民会館、島根

③発表者: Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, Kawahara K, Nakagawa Y, Hiraki

A, Ito T, Shinohara M

発表標題: Overexpression of Nucleostemin contributes to malignant phenotype and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma

発表学会: 21st International conference on oral and maxillofacial surgery

発表年月日: 平成 25 年 10 月 23 日

発表場所: Palau de Congressos, Barcelona, Spain

[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 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

吉田 遼司 (YOSHIDA Ryoji)

熊本大学 大学院生命科学研究部

歯科口腔外科学分野・医員

研究者番号: 10632458

(2) 研究分担者

篠原 正徳 (SHINOHARA Masanori)

熊本大学 大学院生命科学研究部

歯科口腔外科学分野・教授

研究者番号: 90117127

伊藤 隆明 (ITO Takaaki)

熊本大学 大学院生命科学研究部

機能病理学分野・教授

研究者番号: 70168392

中山 秀樹 (NAKAYAMA Hideki)

熊本大学 大学院生命科学研究部

歯科口腔外科学分野・講師

研究者番号: 70381001

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：