

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861958

研究課題名(和文) Brachyuryノックダウンによる口腔癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy by Knockdown of the Brachyury for oral cancer stem cells

研究代表者

小林 洋輔 (KOBAYASHI, YOSUKE)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60636554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞を用い、Brachyury のノックダウンによりその造腫瘍性および転移能の抑制効果と、抗癌剤、放射線感受性に対する効果について検討した。

結果、ヌードマウスを用いた造腫瘍性・転移能実験において造腫瘍性および転移能は減弱した。また、in vitroにおいて放射線に対する耐性及び抗癌剤に対する感受性は増加した。さらに、抗癌剤と放射線の同時併用を行うと、特に抗癌剤耐性の減弱を認めた。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrates that Brachyury knockdown reduces invasiveness and chemoresistance and radioresistance of Cancer stem cells in vivo. Therefore, Brachyury knockdown may be a useful therapeutic tool for sensitizing Cancer stem cells to conventional chemoradiotherapy.

研究分野：腫瘍

キーワード：Brachyury chemotherapy radiation cancer stem cell

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な癌腫において治療耐性の原因として癌幹細胞の存在が指摘されており、癌幹細胞を標的とした治療法の確立が必須である。当研究室では、癌幹細胞の制御に転写因子 Brachyury が関与する事を明らかにしている。

1. 研究の学術的背景

(1) 国内外の研究の動向

① 治療標的としてのがん幹細胞

近年、がん幹細胞の存在が提唱され、幹細胞が治療抵抗性を示すことから新しいがん治療の標的として注目されている。がん幹細胞は薬物治療や放射線治療に抵抗性があるばかりか、局所浸潤能や転移能を示す。すなわち転移を制御する治療のストラテジーにおいてがん幹細胞を治療標的にすることは必須である。

② がん幹細胞がひきおこす上皮間葉移行・がん幹細胞の制御因子

近年 Weinberg らが示唆しているように上皮間葉移行 (EMT) はがん幹細胞様の細胞が起こす現象 (Cell 2008, 133:704-715.) であり、転移をはじめとするがんの悪性形質を発現する細胞であるといえる。さらに、Fernando らは EMT を転写因子 Brachyury によって制御できることを示している (J Clin Invest 2010, 120:533-544.)。このことは転写因子 Brachyury によってがん幹細胞が制御できる可能性を示唆している。

(2) これまでの成果

① 高造腫瘍性・高転移性細胞株 ACCSM-GFP の樹立

当研究室ではこれまでに、ヌードマウス移植において極めて造腫瘍性が低く転移をおこさない腺様嚢胞癌細胞株 ACCS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ベクターを導入することによって得た ACCS GFP を樹立するとともに、ヌードマウスの舌に接種し、形成した腫瘍より分離した細胞を再び舌に接種するこ

とを繰り返す in vivo selection により 100% の造腫瘍性と 100% の顎下リンパ節への転移性を示す ACCS-M GFP を樹立した (Int J Oncol 2011, 38:921-931).

② ACCSM-GFP は EMT を示し、かつ癌幹細胞である

ACCSM-GFP は E-cadherin の減少、Vimentin の増加を特徴とする EMT をしめしていることが親株との比較でしめされた (Int J Oncol 2011, 38:921-931)。さらにスフェア形成能、造腫瘍性、幹細胞マーカーの発現より癌幹細胞であることが示された (BMC Cancer 2012 12:377)。

③ Brachyury は EMT および癌幹細胞を制御する

さらに T-box 転写因子である Brachyury をノックダウンすると、ACCSM-GFP の癌幹細胞の性質、EMT とともに消失することから Brachyury が癌幹細胞および EMT に直接的に関与している因子である可能性も示した (BMC Cancer 2012 12:377)。

④ Brachyury ノックダウンは ACCSM-GFP の浸潤能・薬剤耐性・放射線耐性を抑制する。

ACCSM-GFP に対し Brachyury をノックダウンすると、浸潤能・薬剤耐性・放射線耐性が抑制された

2. 研究の目的

本研究では Brachyury が癌幹細胞を標的とした治療に有用な標的分子であり、臨床応用へ発展させるための遺伝子治療の新しいツールとして応用できる可能性を検索することを目的とする。

3. 研究の方法

① マウス転移モデルにおける Brachyury ノックダウンの造腫瘍性・転移に与える影響の検討

ACCSM-GFP を用いたマウス転移モデルにおいて Brachyury ノックダウンした ACCSM-GFP が造腫瘍性・転移・薬剤耐性・放射線耐性に影響を与えるか検討する。

4. 研究成果

1. Brachyury のノックダウンが造腫瘍性に与える効果

ACCS-M GFP は癌幹細胞であり、ヌードマウスにおいて造腫瘍性を示す。

Brachyury ノックダウンによって癌幹細胞の基本性質である造腫瘍性が消失するか否かを確認するため、ヌードマウスの舌に ACCS-M GFP 及び Brachyury のノックダウン細胞株をそれぞれ接種し、造腫瘍性を検討した。ACCS-M GFP ではマウス舌に 8 匹中 8 匹 (100%) が腫瘍形成を認めたのに対し、Brachyury のノックダウン細胞株では 8 匹中 4 匹 (50%)、と腫瘍形成率が低下していた。特に Brachyury のノックダウン細胞株では、腫瘍形成した場合でも腫瘍体積が小さく、励起光下での GFP 発光も認められなかった。

腫瘍増殖曲線においても、Brachyury のノックダウン細胞株では増殖スピードが ACCS-M GFP と比較し、顕著に抑制されていた。

2. Brachyury ノックダウンの転移能に対する効果

腫瘍細胞接種後、腫瘍体積が 100 mm³ に達した時点でマウスを屠殺し、顎下リンパ節、肺を摘出した。Brachyury のノックダウン細胞株では舌に腫瘍が形成されないか、100 mm³ に達しなかったため、ACCS-M GFP 接種マウスと同時に屠殺した。ACCS-M GFP では、腫瘍の転移は顎下リンパ節に 8 匹中 8 匹 (100%)、肺に 8 匹中 7 匹 (87.5%) 認められたのに対し、Brachyury のノックダウン細胞株では顎下リンパ節および肺への転移は認めなかった。

ヌードマウスを用いた造腫瘍性・転移能実験においても造腫瘍性効果 50%、転移能 0% に減弱した。

3. Brachyury ノックダウンが抗癌剤耐性に与える影響

癌幹細胞は様々な抗癌剤に対して耐性を示すことがよく知られている。

Brachyury をノックダウンすることが、抗癌剤耐性に対して影響を与えるか否かを検討した。各種抗癌剤に対する ACCS GFP と ACCS-M GFP の感受性を生細胞の割合 (cell viability) を基に比較した。ACCS-M GFP は ACCS GFP より種々の抗がん剤に耐性を示した。ACCS-M GFP の IC₅₀ 値は ACCS GFP と比較し 1.2 ~ 355 倍といずれの抗癌剤に対しても有意に高値であった。

一方、Brachyury のノックダウン細胞株では、抗癌剤耐性は ACCS-M GFP と比べ有意に低下した。

4. Brachyury ノックダウンが放射線耐性に与える影響

癌幹細胞は、放射線に対しても耐性を持つことが知られている。そこで、in vitro における細胞の放射線耐性を検討した。ACCS-M GFP では ACCS GFP と比較し、強い放射線耐性を示した。

放射線照射後の ACCS GFP および ACCS-M GFP における細胞生存率は、30Gy 照射後 48 時間ではそれぞれ 53%と 77%、30Gy 照射後 72 時間ではそれぞれ 40%と 60%であった。Brachyury のノックダウン細胞株の生存率は 30Gy 照射後 48 時間ではそれぞれ 65%、70%であり、30Gy 照射後 72 時間で 42%、50%と ACCS-M GFP と比較し、低下を認めた。Brachyury ノックダウンは有意に放射線耐性を減弱させ、ACCS GFP と同程度まで耐性が減弱した。

5. Brachyury ノックダウンが抗癌剤・放射線同時併用療法に与える影響

Brachyury ノックダウンによる抗癌剤・放射線同時併用に対する効果を比較、検討した。Brachyury のノックダウン細胞株では放射線同時併用により、ACCS-M と比較し、抗癌剤耐性が減弱していた。

放射線同時併用により抗癌剤耐性が著明に減弱した。

5. 主な発表論文

(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 1 件)

Int J Oncol. 2014 Apr; 44(4): 1107-1117.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(小林 洋輔)

研究者番号: 60636554

(2)研究分担者

(なし)

研究者番号:

(3)連携研究者

(なし)

研究者番号: