

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463035

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるがん幹細胞ニッチの同定と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of cancer stem cell niche in oral cancer and their therapeutic application

研究代表者

松沢 祐介 (Matsuzawa, Yusuke)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30351620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん幹細胞維持における腫瘍血管内皮細胞の役割を検討した。がん幹細胞と血管内皮細胞の相互作用をin vitroで解析した。がん幹細胞を多く含むがん細胞集団の培養上清を血管内皮細胞に処理すると、腫瘍血管内皮マーカーの発現が亢進した。がん細胞と腫瘍血管内皮細胞を共培養し、がん細胞のシグナルを解析した。腫瘍血管内皮細胞、特に高悪性度のがん由来腫瘍血管内皮細胞と共培養した系において、がん細胞におけるNF- κ BやERK1/2の経路が活性化した。さらに共培養でコロニー形成が見られ、腫瘍血管内皮細胞が発現する分子が幹細胞性維持に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of tumor endothelial cells (TECs) for maintenance of cancer cell stemness. We analyzed the crosstalk of cancer stem cells (CSCs) and endothelial cells in vitro. Treatment of cultured conditioned medium of CSC-enriched cells increased the expression of TEC markers in endothelial cells. We next analyzed the signal pathways after co-culture of cancer cells with TECs. NF- κ B and ERK1/2 pathways were activated in cancer cells after co-culture with high grade tumor derived TECs. In addition, colony formation was observed by co-culture with cancer cells and TECs. These data suggested that TEC-expressing molecules are involved in maintenance of stemness in cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がん幹細胞 腫瘍血管

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞 (Cancer Stem cell: CSC) は、がん細胞の中でも高い薬剤耐性、自己複製能を持っており、抗がん剤や放射線治療への抵抗性が高く、種々の治療によって他のがん細胞が死滅した後にも生き残り、がんの再発・転移の原因となることが知られている。

近年、血管領域で組織幹細胞の維持がなされているという血管ニッチの概念が提唱されており、種々の臓器において組織特有の幹細胞の局在について解析が進められている。血管内皮細胞と血管近傍に存在するがん幹細胞との相互作用を理解することは、がん幹細胞を標的としたがん治療には必須である。がん幹細胞ニッチにおいて、腫瘍血管はがん幹細胞へ栄養や酸素を運搬するだけでなく、生理活性因子 (angiocrine factor) を分泌し、がん幹細胞の維持調節を行うことが知られている。われわれはこれまで、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell: TEC) の分離と培養に成功し、それらが正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cell: NEC) と比べて染色体異常や薬剤耐性、特異遺伝子の発現など様々な異常性があることを報告した。また TEC においてがん幹細胞の維持に重要な COX-2 や SDF-1, IL-6 などの様々なサイトカインの発現が亢進していることも見出してきた。腫瘍血管が分泌するこれらのサイトカインは、周囲のがん細胞やがん間質細胞にパラクラインで作用することも見出している。さらに、腫瘍血管内皮細胞の性質は、がんの悪性度によって異なることも報告しており、口腔がん幹細胞と血管内皮細胞の間にも相互作用が存在するのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、がん幹細胞と血管内皮細胞との相互作用を解析し、がん幹細胞維持における腫瘍血管内皮細胞の役割を検討し、がん幹細胞ニッチを標的とした新しいがん治療法の開発の基盤的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞の分離・培養

ヌードマウスのヒト腫瘍細胞皮下移植腫瘍から腫瘍血管内皮細胞 (TEC) を、コントロールとして正常マウスの皮膚から正常血管内皮細胞 (NEC) を分離培養する。分離には、CD31 抗体および CD45 抗体を用いて磁気細胞分離装置 MACS とセルソーター FACS Aria により、CD31+CD45 - の血管内皮分画を採取する。分離した血管内皮の特性解析を PCR 法とフローサイトメーターを用いて行い、分離後の血管内皮細胞が血管内皮マーカーを発現し、他細胞の混入がないことを確認する。

(2) がん幹細胞マーカー ALDH の発現解析

がん幹細胞マーカーとして ALDH を用いて、腫瘍組織における ALDH 陽性細胞を組織免疫

染色で可視化する。血管との局在を見るために、血管は抗 CD31 抗体で染色する。腫瘍組織としては、マウス皮下移植腫瘍とヒト臨床検体手術摘出組織標本を用いる。

(3) がん幹細胞の培養上清処理

がん幹細胞を多く含む細胞集団 (CSC) とがん幹細胞をほとんど含まないがん幹細胞集団 (non-CSC) から培養上清を回収し、血管内皮細胞に処理する。その後、血管内皮細胞の RNA を抽出し、種々の遺伝子発現を Real-time PCR 法で比較検討する。

(4) がん幹細胞と血管内皮細胞の共培養

シグナル解析

血管内皮細胞の性質の違いががん細胞に及ぼす影響を検討するため、複数の腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞を用いて、がん細胞と共培養する。その後、がん細胞の生存能に関わるシグナル (NF- κ B, ERK1/2) の解析を Western blotting で行う。

コロニー形成・局在解析

複数の腫瘍血管内皮細胞とがん細胞を共培養し、コロニー形成を観察する。コロニーの数や大きさ、コロニー内での細胞の局在を比較解析する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の分離培養:

腫瘍血管内皮細胞と正常由来血管内皮細胞を CD31+CD45 - 分画として分離した。培養後に PCR 法ならびにフローサイトメーターにより CD31, CD144 などの血管内皮細胞マーカーが陽性で、かつ CD11b, CD45 などの血球マーカーが陰性であることを確認した。分離した細胞が純度の高い血管内皮細胞であることが確認された。

(2) がん幹細胞マーカー ALDH の発現解析

マウス移植腫瘍の凍結切片を用いて、CD31 と ALDH の蛍光二重免疫染色を行った。ALDH 陽性がん幹細胞が観察された。また一部の腫瘍血管にも ALDH 陽性細胞が見られ、血管の幹細胞性も観察された。さらにヒト臨床検体を用いて解析したところ、同様に ALDH 陽性がん幹細胞ならびに ALDH 陽性腫瘍血管が観察された。

(3) がん幹細胞の培養上清処理

がん幹細胞が血管内皮細胞に及ぼす影響を検討するため、CSC と non-CSC の培養上清を処理された血管内皮細胞で、腫瘍血管内皮特異マーカーの発現を比較した。CSC 培養上清で処理された血管内皮細胞において、一部の腫瘍血管内皮マーカーの発現亢進がみられた。

(4) がん幹細胞と血管内皮細胞の共培養

シグナル解析

血管内皮細胞は、悪性度の高いがん由来の腫瘍血管内皮細胞、低悪性度のがん由来腫瘍血管内皮細胞、ならびに正常皮膚由来血管内皮細胞と、Non-CSC がん細胞と間接共培養したところ、がん細胞の NF- κ B ならびに ERK1/2 は悪性度の高いがん由来腫瘍血管内皮との共培養で活性化した。これらはがん細胞の TLR2, TLR4 阻害によりキャンセルされたことから、TLRs を介した分子の相互作用であることが示唆された。

コロニー形成・局在解析

複数の腫瘍血管内皮細胞とがん細胞を共培養し、コロニーを観察した。いずれの血管内皮細胞ともコロニーを形成した。中でも、悪性度の高いがん由来腫瘍血管内皮細胞との共培養において、コロニーが大きく、数も多かった。コロニー内のそれぞれの細胞の位置関係をコンフォーカル顕微鏡で観察した。血管内皮細胞の違いにより、がん細胞の局在が変化した。したがって、血管内皮細胞が発現する何らかの分子がこれらの現象に関与している可能性が示唆された。分子メカニズムについては、現在さらなる解析を進めている。

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 10 件)

Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohno Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K. asoHibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 37, 1219-1226, 2017 査読あり
doi: 10.21873/anticancer.11437

*Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M. Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1. *J Oral Biosci*, 59(2017), 50-54, 2017. 査読あり
doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004

*Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels. *Pathol Int*. 66(12), 687-694, 2016. 査読あり
DOI: 10.1111/pin.12474

*Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik.

Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells. *Hokkaido J. Dent. Sci.* 37:40-48, 2016. 査読あり

hdl.handle.net/2115/63416

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., *Hida K. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep*. 6, 28039, 2016. 査読あり

doi: 10.1038/srep28039

Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and *Hida K.: CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015 査読あり
DOI: 10.1002/ijc.29655

Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and *Hida K.: Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 査読あり
DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017

Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., *Hida K: Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014 査読あり
DOI: 10.1371/journal.pone.0113910.

Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and *Hida K.: Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014 査読あり
DOI: 10.1111/cas.12549.

Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T., Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara

N., Nonomura K., *Hida K. : Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014 査読あり
DOI: 10.1111/cas.12394

[学会発表](計 12 件)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K. : Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, (Sheraton Boston Hotel, Boston, Massachusetts, USA) (国際学会)

間石奈湖, 樋田京子: 第75回日本癌学会学術総会特別シンポジウム2「癌研究における女性研究者」, “腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進”, 2016.10.7(パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市))招待講演

間石 奈湖, 樋田 京子: 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「酸化ストレスと発がん～最新の知見～」, “活性酸素が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響”, 2016.8.31(仙台国際センター(宮城県・仙台市))招待講演

Maishi N. : Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (国際学会) 2016.3.30 (Breckenridge, Colorado, USA)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference “Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics” (国際学会) 2016.2.17 (Maui, Hawaii, USA)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015 (国際学会) 2015.9.27 (Vienna, Austria)

間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

Maishi N., Hida K. : Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization (招待講演)(国際学会) 2015.5.13 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府・吹田市)

間石奈湖, 樋田京子: 第 33 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, “腫瘍血管内皮のがん転移促進機構”(招待講演) 2015.1.30 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

Maishi N., Hida K. : The 17th HU-SNU JOINT SYMPOSIUM “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anti-angiogenic therapy”, (招待講演)(国際学会) 2014.11.28 北海道大学(北海道・札幌市)

間石奈湖, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014.9.26 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Maishi N., Hida K. : 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anticancer drugs”(招待講演)(国際学会) 2014.5.26 (Istanbul, Turkey)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松沢 祐介 (MATSUZAWA, Yusuke)
北海道大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 30351620

(2) 研究分担者

間石 奈湖 (MAISHI, Nako)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号: 00632423

秋山 廣輔 (AKIYAMA, Kosuke)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員
研究者番号： 10609100

樋田 泰浩 (HIDA, Yasuhiro)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号： 30399919