

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10830

研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞マーカーCD271によるアクチン細胞骨格系制御機構の解明と治療戦略

研究課題名(英文) Actin cytoskeleton control by a HNSCC stem cell marker CD271

研究代表者

松浦 一登 (Matsuura, Kazuto)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：70271947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CD271陽性頭頸部がん幹細胞とアクチン細胞骨格系の関連を明らかにするためCD271と会合するCortactinの寄与を検討した。CD271陽性細胞はCortactin発現と相関した。Cortactin低下細胞は細胞遊走能が低下し、Fアクチン構造変化を主とする細胞形態の異常が認められ、CD271低発現細胞と同様に腫瘍形成能が低下した。一方、癌幹細胞性に関するCortactinの役割は限定的であった。CortactinはCD271とともに頭頸部がんの治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD271 is a candidate cancer stem cell marker for HNSCC, but its functional role is left undetermined. By a co-purification approach, we identified Cortactin as a binding partner. CD271 positive cells expressed Cortactin, and cortactin-low cells showed decreased tumorigenesis and motility, which is similar to the CD271-loss phenotypes. Notably, actin network was damaged in cortactin-low cells. These results suggest CD271 and cortactin are potential therapeutic targets of head and neck cancer.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部がんは咽頭・喉頭等に発生するが、扁平上皮がんが大部分を占める。強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘤を形成しながら頸部に浸潤・転移する。手術不能症例や再発例では、予後不良であるため、新たな治療戦略が必要となっている。一般に明確なドライバー変異がないため、治療戦略上検討しなければいけない点が多い。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が用いられるようになったが、外科的切除以外に根治に至る有効な薬剤は無く、新規治療薬の開発が急務となっている。

(2) 腫瘍は単一の細胞集団ではなく、近年の研究において「がん幹細胞」が注目されている。幹細胞性を有する細胞 (CSC) が造腫瘍能を担っており、大多数の非がん幹細胞 (non-CSC) は、抗がん剤および放射線に感受性を有する。CSC は、①自己複製能、②多分化能、③抗がん剤・放射線抵抗性、を3大主徴とし、治療抵抗性の原因と目される。乳がんや脳腫瘍などで実際に CSC の存在が報告された。頭頸部がんにおいてもがん幹細胞理論はあてはまると考えられ、CSC を標的とした治療は、次世代の先進的治療法として期待を集めている。

(3) 頭頸部がんにおいて CSC を正確に区別する方法があれば、新たな選別的治療が開発できる可能性がある。実際に、乳がん等では、CD44⁺/CD24⁻が CSC マーカーであることが報告され、CD44 を治療標的とする実用化が進んでいる。そこで頭頸部扁平上皮がん臨床検体を用いてセルソーターを利用して細胞表面抗原別に細胞を分取し免疫不全マウスに移植した。その結果、CD271 が頭頸部がんのがん幹細胞マーカーであることを見出した。CD271 と機能的に共役する分子を同定すれば、CD271 と合わせて治療標的としての開

発が可能と考えられた。

(4) 第2のがん幹細胞関連分子を求め、申請者は CD271 に結合する分子のプロテオミクス解析を行った。その結果 Cortactin が、会合蛋白に含まれることを突き止めた。Cortactin は 11q13 にマップされ、頭頸部がんにおいて頻りに遺伝子増幅が認められる領域にコードされている。F-Actin と結合するほかアクチン再構成を制御するほか、細胞周期や脱アセチル化を制御することで、増殖にも関わっていることが報告されている。これまで Cortactin と CD271 がん幹細胞との関連は未解明であった。

2. 研究の目的

(1) Cortactin は単なる幹細胞マーカーではなく、CD271 と協調してがん幹細胞性と悪性化能を付与する、という仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証するために以下の各点を明らかにする。①CD271 陽性頭頸部がんのがん幹細胞性発揮に必要な Cortactin の機能は何か？、②アクチンリモデリングは、がん幹細胞性を制御するか？、③CD271-Cortactin パスウェイを標的とした頭頸部がん治療は構築できるか？

以上の解析により、本研究では Cortactin を切り口とした頭頸部がん幹細胞のバイオロジーを明らかにし、特異的治療法開発の基盤構築に挑むことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Cortactin の阻害によって、がん幹細胞の性質を阻害できるかを検討する。頭頸部がん細胞株 HPCM2 を用いて Cortactin の shRNA を導入し阻害する。同時に Cortactin 発現低下細胞をスクリーニングする。得られた細胞を用いて、がん幹細胞性と悪性化の評価を以下の通り計画する。

①幹細胞性マーカーの発現:realtime-PCR を

用いた Nanog 等多分化マーカーの比較、②浸潤能評価：マトリゲルチャンバーを用いた invasion assay による比較、③in vivo 評価：免疫不全マウス移植系 (NOG) を用いる。腫瘍縮小効果について調べる。

(2) CD271-Cortactin 連携による腫瘍浸潤能の誘導とアクチンリモデリングの解析：腫瘍頭頸部がん細胞株を用いて CD271 が誘導する浸潤を in vitro で調べる。Cortactin 複合体との連携について共焦点顕微鏡を用いて観察する。さらに、頭頸部癌の悪性化と密接なアクチン重合について調べる。共焦点顕微鏡観察を行い、細胞形態の変化やアクチンの染色性を解析する。

4. 研究成果

(1) CD271 と Cortactin 複合体の結合を調べるため、タグ付き CD271 を細胞に発現させ免疫沈降した。Cortactin および Actin が TOF-MS 法によって同定されることを確認した。

(2) CD271 ノックダウンを行ってシグナル伝達と遊走を調べた。超免疫不全マウス (NOG) に移植したところ、腫瘍形成能が低下したため、腫瘍形成には、CD271 が必要であると考えられた。シグナル伝達系を解析したところ、p42/44ERK が減少し RhoA によるとみられる細胞遊走が抑制された。RhoA の活性化は Cortactin 複合体との関連が深いため、Cortactin が CD271 会合分子として機能的に有望であることが示唆された。

(3) HPCM2 株に対して遺伝子ノックダウンを行い、Cortactin 発現細胞と Cortactin 発現低下細胞を樹立した。Cortactin 発現低下細胞は同発現細胞に比べて細胞遊走能が低下していた。さらに、レーザー共焦点観察において、Cortactin 発現低下細胞は F アクチン

構造変化を主とする細胞形態の異常が認められ細胞骨格の形成不全が観察された。さらに、超免疫不全マウス (NOG) に移植したところ、腫瘍形成能が低下したため、腫瘍形成には、Cortactin の貢献が高いと考えられた。

(4) がん幹細胞性に関する Cortactin の役割は限定的であり、幹細胞関連遺伝子の制御はほとんど認められなかった。

以上の結果から、Cortactin は頭頸部がんの治療標的となりうることが示唆された。Cortactin は悪性形質を示すがんに発現していることから、今後 CD271 と同様に治療標的となりうると思われる。

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3件)

1. Homma A, Onimaru R, Matsuura K, Robbins KT, Fujii M.: Intra-arterial chemoradiotherapy for head and neck cancer. Jpn J Clin Oncol. (査読有) 2015 Oct 20. pii: hyv151. doi: 10.1093/jjco/hyv151 Jpn J Clin Oncol. 2016 Jan;46(1):4-12. doi: 10.1093/jjco/hyv151.
2. Tahara, M; Kiyota, N; Mizusawa, J; Nakamura, K; Hayashi, R; Akimoto, T; Hasegawa, Y; Iwae, S; Monden, N; Matsuura, K.; Fujii, H; Onozawa, Y; Homma, A; Kubota, A; Fukuda, H; Fujii, M.: Phase II trial of chemoradiotherapy with S-1 plus cisplatin for unresectable locally advanced head and neck cancer (JCOG0706). Cancer Sci. 2015

Jun;106(6):726-33. doi:
10.1111/cas.12657. Epub 2015 Apr 1.

3. Mochizuki M. Tamai K. Imai T. Sugawara S. Ogama N. Nakamura M. Matsuura K. Yamaguchi K. Satoh K. Sato I. Motohashi H. Sugamura, K. & Tanaka, N. CD271 regulates the proliferation and motility of hypopharyngeal cancer cell. Scientific Reports 6, Article number: 30707. (2016) doi: 10.1038/srep30707

[学会発表] (計2件)

- ①望月麻衣 玉井恵一、今井隆之、小鎌直子、中村真央、松浦一登、山口壹範、佐藤賢一、佐藤郁郎、菅村和夫、田中伸幸

頭頸部癌において CD271 は増殖・浸潤を制御する

第 39 回 日本分子生物学会 年会

2016年12月2日 神奈川県横浜市

- ②小鎌直子、西川路武人、小嶋克彦、松浦一登、田中伸幸

S100A10 regulates malignant phenotype of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)

第 76 回日本癌学会学術総会

2017年9月28日 神奈川県横浜市

[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:

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

松浦 一登 (MATSUURA, Kazuto)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号: 70271947

(2) 研究分担者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号: 60280872

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者