

令和元年6月19日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11733

研究課題名(和文) 口腔癌におけるがん幹細胞の特性を利用した新規治療戦略の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of new treatment strategy using the characteristic of cancer stem cells in oral cancer

研究代表者

渡辺 正人 (Watanabe, Masato)

東京医科大学・医学部・臨床講師

研究者番号：40349460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌組織内における頭頸部がんの特異的な幹細胞マーカーの発現を免疫組織化学的染色法を用いて検討した。特に腫瘍先進部を対象に評価し、同時に病理組織学的悪性度との関連性も検討した結果、特異的な発現様式を認め組織学的悪性度とも一定の関連性を見出した。同様に腫瘍組織内のFbxw7の発現を検討した結果、口腔扁平上皮癌においても発現を認めたが、悪性度の高い症例では発現は認められなかった。腫瘍組織切片上でレーザーマイクロダイセクションを利用してFbxw7の検出を試みたが、分子レベルでは認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまでにない概念で、がん組織の治療感受性を高める手法を構築するための基礎的研究として位置付けて来た。着目したのは治療抵抗性を示すがん幹細胞の特性の1つであるFbxw7の存在である。その特性を逆に利用することで感受性がん細胞へと能動的に移行させることは臨床応用の可能性につながると考える。本研究ではまず基礎的な段階で口腔癌組織上にがん幹細胞の発現様式を認識し、そこに細胞周期の維持に関わるFbxw7が存在するかを研究した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the expression of specific cancer stem cell markers for head and neck cancer with immunohistochemistry in oral squamous cell carcinoma. In particular, the expression was evaluated at the front parts of tumor. The relationships between the expression and malignant grade were also examined. The expression pattern was unique and showed an association with malignant grade. Then, the expression of Fbxw7 was examined in tumor tissue in the same way. Similarly, the tumor cells showed positive for Fbxw7. However, there were negative tumor cells in the high grade cases of malignancy. Fbxw7 have been tried to detect from tumor tissue fragment using laser microdissection. Finally, Fbxw7 on molecular level could be not detected.

研究分野：外科系歯学関連

キーワード：口腔扁平上皮癌 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌治療における化学療法の役割として、induction therapy や一次治療後の再発および転移の予防、治療に貢献する概念が重要視されている。頭頸部癌では一次治療後一年以内での再発、転移の可能性が7割以上あり、その後の予後に大きく影響を与える。いかに再発、転移を制御するかが予後を規定する要因と考えられる。

(2) そこでこれまで我々は抗癌剤に対する代謝酵素を抗癌剤感受性予測因子と想定し検討を重ねてきた(Watanabe et al. Oral Oncology 2011)。口腔扁平上皮癌に対する臨床上使用可能な抗癌剤の一つであるフッ化ピリミジン系を対象にその代謝酵素の発現の多寡で効果の予測モデルを構築した(Watanabe et al. Jpn J Head Neck Cancer 2008)。

(3) 近年、分子標的治療薬である抗 EGFR モノクローナル抗体としてセツキシマブが頭頸部癌でも使用されるようになり、抗癌剤の有意な上乘せ効果があり生存期間の延長を認めている。しかし、有害事象は減少したが治療の長期化を要し、中断すると腫瘍が活発化する。

(4) これまでの薬物療法は増殖している腫瘍実質つまり細胞周期に入っているがん細胞を標的として来た。癌組織は heterogenous であるため理に叶った治療ではあるが、特に進行癌では根治に至ることは困難である。一度腫瘍細胞数が減少するが再度増生する。がん細胞ポピュレーションの中に抵抗性を示す細胞の存在がある為と考えられている。2000年以降各種がん幹細胞の存在が明らかにされてから、この腫瘍形成能を持つ細胞が治療抵抗性を示し、その多くは静止期(G0期)にあることが報告されている。

(5) がん幹細胞の静止期の維持に関与するタンパクにユビキチンリガーゼ F-box and WD40 domain protein 7(Fbxw7)が注目されている。これは細胞分裂を促進させる oncoprotein を分解し G0 期を維持する役割がある(Welcker et al. Nat Rev Cancer 2008)。現在、がん幹細胞の特性が各癌種で解明されてきているが、治療に応用する報告は少ない。Fbxw7 の阻害により静止期から cell cycle へ追い出し、腫瘍の感受性を高める研究が慢性骨髄性白血病で応用されている(Takeishi et al. Cancer Cell 2013)。

(6) 我々はこれまで増殖期にあるがん細胞を対象に蛋白レベルで代謝酵素の発現量を算出し、薬剤効果との関係を検討してきた(Watanabe et al. Jpn Head Neck Cancer 2008)。平成 25 年度より科学研究費助成事業の援助を受け分子レベルで代謝酵素の発現変化を検討して来たが効果判定に寄与する明瞭な結果は得られなかった。今後は薬剤感受性低下の原因を静止期の口腔がん幹細胞に標準を向けた。いまだこの分野は未開拓であり、特に口腔癌では他臓器の癌種に比較し臓器特有な知見が少ない。治療抵抗性の原因機序解明を口腔がん幹細胞の特性に向けることは、より精度を上げ根治性を向上させる新たな治療戦略の開発につながると考えた。本研究はその基礎として捉え将来的に臨床応用へ展開できるように一貫した研究計画を立案した。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌を対象として、治療抵抗性を示すがん幹細胞の特定と特性について探求すべく以下のことを検討項目とした。

(1) 切除腫瘍組織内からがん幹細胞の単離：切除組織より ALDH 酵素活性を測定して ALDH 発現がん細胞ポピュレーションを単離し、同時に幹細胞マーカーである CD44 の抗体を用いて発現する細胞を選別しがん幹細胞を同定、分離すること。

(2) がん幹細胞に対する薬剤感受性試験の検討：in vitro 環境下で抗癌剤を使用し化学療法に対する viable な細胞数を計測しがん幹細胞の抵抗性を検討すること。

(3) 切除腫瘍組織を対象としたがん幹細胞マーカー発現の検討：がん幹細胞に特有の各種マーカー (BMI-1、ABCG2、HGF R、Lgr5/GPR49) の発現を検討し口腔癌幹細胞のプロファイルを明らかにすること。

(4) がん幹細胞に存在する Fbxw7 の解明：低感受性腫瘍組織上で幹細胞が認められる部位から DNA を抽出し Fbxw7 の存在を調べる。また、切除腫瘍組織を対象とし Fbxw7 の発現すること。

(5) がん幹細胞特有に発現変化する miRNA の同定：がん幹細胞組織から miRNA 発現プロファイルを解析し、発現シグナルが観察された miRNA の発現量を real time RT-PCR で調べる。

(6) がん幹細胞特有に発現する miRNA の標的遺伝子の解明：コンピュータによる miRNA 標的予測法を使用し、標的候補の 3' UTR との相補性を評価して追求すること。

3. 研究の方法

対象は 2013 年から 2015 年までに当科を受診された未治療の口腔扁平上皮癌 30 症例を対象に生検あるいは切除された腫瘍組織をホルマリン固定からパラフィン標本を作製した。また同時に新鮮組織片も採取し準備した。

(1) 切除された癌組織よりコラゲナーゼ処理した細胞を CSC enrich 培地で継代培養後、Aldefluor assay で抗 CD44 抗体を作用させ ALDH 酵素活性を測定し FACS を使用することで ALDH+/CD44+陽性細胞ポピュレーションを同定し単離を試みた。

(2) 上記 1 で単離されたがん幹細胞を 96 well プレート上に 5×10^3 cells/well に調整し、抗

癌剤を加え 48 時間 37 ° でインキュベートした。その後、生細胞の数を WST-1 proliferation assay Kit(Roche, Mannheim, Germany)で測定し、がん幹細胞の抗癌剤抵抗性を検討した。

(3) 頭頸部癌に特異的な幹細胞マーカーである BMI-1、ABCG2、HGF R、Lgr5/GPR49 を対象とした各抗体を用い免疫組織化学的染色法にて組織中に発現する幹細胞マーカーを検索した。その発現様式からがん幹細胞を組織切片上で特定を図った。また、腫瘍浸潤先進部の組織学的悪性度 (Bryne による分類) と各マーカーの発現様式との関連性も検討した。

(4) 上記に示す方法で特定された組織上のがん幹細胞発現部位より Fbxw7 の検出を試みた。

パラフィン包埋切片をトルイジンブルーで染色し、レーザーマイクロダイセクションを使用してがん幹細胞発現部位を分離しサンプリングした後、回収されたサンプルから DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を図った。比較対照としてがん幹細胞以外の腫瘍実質 (細胞周期の増殖期) から同様にダイセクションにより DNA の抽出を行ってみた。

DNA 抽出後、既知の塩基配列の primer および probe を作製し real time PCR にて増幅し、その後 PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にかけ Fbxw7 に特異的なバンドを検索した。

Fbxw7 を対象とした抗体を用いて免疫組織化学的染色法にて組織中に発現する Fbxw7 を検索した。

(5) がん幹細胞と増殖期がん細胞の両群で発現する miRNA の違いを調べた。まず、網羅的な発現分析として DNA チップ (3D-Gene® 東レ株式会社) を使った発現プロファイル解析を行い、その発現プロファイルから違いが観察された miRNA をさらに RT-real time PCR 法によって発現量を解析した。miRNA 発現解析のプロトコールは以下に示した。

miRNA 抽出 (total RNA として 5 µg 以上) 蛍光標識 (Cyanine 3) 反応 ハイブリダイゼーション (micro RNA 検出用オリゴ DNA プローブ) 専用の DNA マイクロアレイスキャナーで蛍光量の解析 画像化

両群のプロファイリング画像の比較 発現シグナルの差が観察される miRNA を同定 RT-real time PCR 法で差が観察された miRNA の発現量を解析

(6) 上記の同定された miRNA の標的遺伝子を解明するにあたり、主にコンピュータによって予想された miRNA の標的に依存しているかは、特定の生物学的経路に關与する miRNA に基づく推測に依存している。特にコンピュータによる miRNA 標的予測法は、miRNA と標的遺伝子との塩基対形成の性質に基づいている。miRNA の標的部位に関しては、5' 端の方が 3' 端よりも標的遺伝子と塩基対形成しやすい傾向がある。まずコンピュータによる標的の解明を試みた。

ヒト miRNA の塩基配列は web 上で公開されている Rfam データベースを、ヒト遺伝子の 3' UTR 塩基配列は同様に Entrez nucleotide データベースから入手した。

web 上で自由にアクセスできる標的予測プログラム miRanda を利用した。miRNA 標的を予測するコンピュータを用いた方法は、miRNA の 5' 端の 2~8 塩基付近の塩基対形成、もしくは miRNA とその標的遺伝子との熱力学的安定性を重視しつつ、miRNA と標的候補の 3' UTR との相補性を評価して予測してみた。

4. 研究成果

(1) 切除腫瘍組織内からがん幹細胞の単離では、安定した継代培養が出来ず、ALDH+/CD44+ 陽性細胞ポピュレーションの同定では正確性を欠いた。

(2) 上記結果のため、薬剤感受性試験の結果は不明瞭となった。

(3) 切除腫瘍組織を対象としたがん幹細胞マーカー (BMI-1、ABCG2、HGF R、Lgr5/GPR49) 発現の検討では、全てのマーカーで発現を認めた。お互いの発現の強度に相関性が認められた。それぞれのマーカーの発現は治療抵抗性とは関連を示さなかった。組織学的悪性度との関係では、陽性症例に高悪性度を示す傾向があった。

(4) レーザーマイクロダイセクションを使用した DNA サンプリングでは Fbxw7 に相当するバンドは認められず有効な検出には至らなかった。腫瘍組織を対象に Fbxw7 の発現を免疫組織化学的染色にて検索した結果、35%は陽性を示し、残りの 65%は弱陽性あるいは陰性を示した。発現は腫瘍細胞核に認められた。がん幹細胞マーカーが発現する腫瘍実質に相当する部位におおよそ Fbxw7 の発現を認めた。特に治療低感受性腫瘍組織では陽性傾向を示した。また、組織学的悪性度との関係では、悪性度の高い症例で Fbxw7 の発現は陰性を示した。

(5) がん幹細胞特有に発現変化する miRNA の同定では、網羅的な発現プロファイル解析の結果、いくつかの miRNA が候補として認められた。その後の PCR で発現量に明確な差が出なかった。発現量から、miR-24、miR-27、miR-92、miR-25、miR-223 が推察された。

(6) 推察された miRNA の標的遺伝子の解明では、3' UTR との相補性を有する遺伝子の解明に至らなかった。少なくとも今回、Fbxw7 に関連した遺伝子は該当しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：河野 通秀

ローマ字氏名：Kohno Michihide

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 00421066

(2)研究分担者

研究分担者氏名：古賀 陽子

ローマ字氏名：Koga Yoko

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10392408

(3)研究分担者

研究分担者氏名：里見 貴史

ローマ字氏名：Satomi Takafumi

所属研究機関名：日本歯科大学

部局名：生命歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70276921

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。