

令和元年6月14日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19761

研究課題名(和文)病態解明と新規治療薬開発を可能にする口腔扁平上皮癌高転移モデルマウスの創出

研究課題名(英文) Establishment of highly metastatic mice model of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

常松 貴明(Tsunematsu, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70726752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌は口腔に発生する癌の最も多い腫瘍型であり、その転移の有無が予後を規定する非常に重要な因子である。しかし、これまでの研究の多くがin vitroの実験系から得られたものがほとんどで実際の生体内での実験系あまり研究されてこなかった。そこで本研究では、マウス由来口腔扁平上皮癌細胞株を同所移植することで、生体内でshRNAライブラリーを用いて転移に重要な因子を同定し、高転移マウスモデルを作製することを試みた。研究期間内にshRNAライブラリーを使ったスクリーニングの実施には至らなかったが、in vivoイメージング可能なマウス由来口腔扁平上皮癌細胞株を作製することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の予後を規定する因子である転移の機構をin vivoで解明することを目的として、口腔扁平上皮癌高転移マウスモデルの作製を試みた。現在までに高転移モデルの樹立まで至らなかったが、in vivoイメージング可能なマウス由来口腔扁平上皮癌細胞株を作製した。本細胞株を用いて今後shRNA libraryスクリーニングを実施し、最終的に口腔扁平上皮癌高転移マウスモデルを作製し、口腔扁平上皮癌の治療や病態解明に役立てることが可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma is major type of tumor arising from oral cavity. It is extremely important factor for poor prognosis. However, previous studies are almost using in vitro experiments but not in vivo experiments. In present study, we tried to establish highly metastatic mice model of oral squamous cells carcinoma by using orthotropic transplantation and shRNA library screening. Finally, we could not reach to perform shRNA library screening but established murine oral squamous cell carcinoma cell lines which can apply for in vivo imaging.

研究分野：病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は口腔領域の悪性腫瘍の80%以上を占める主要な癌である。その5年生存率は転移のないStage IやIIの症例では80%以上と多臓器の癌に比べ、比較的予後の良い癌として知られている。一方で、転移のあるStage IIIやIVの症例では40%ほどに急激に低下する。従って、転移の有無は予後を規定する最も重要な因子であると考えられる。しかし、転移を抑制するような分子標的療法は未だ開発されておらず、その開発は急務であると考えられる。

癌の浸潤・転移過程において、上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)と呼ばれる現象がその重要なステップであることが明らかとなってきた。EMTとは癌細胞が上皮としての性質を喪失し、間葉系の性質を獲得する現象であり、運動能及び浸潤能の亢進を介して、癌の転移を促進し、結果的に予後の増悪につながる。しかし、実際に転移巣で癌が増殖し腫瘍を形成する、つまり転移が成立するにはEMTを起こしたままの状態では不可能であり、MET(Mesenchymal-Epithelial Transition)を起こす必要があることが近年明らかとなってきた。従って、これまで我々を含めた世界中の研究グループがEMTのメカニズムを研究してきたが、EMTを抑制するだけでは転移を抑制できない可能性が考えられる。実際に我々の経験した口腔扁平上皮癌の亜型である紡錘細胞癌(EMTを起こし、間葉系の性質を示す扁平上皮癌)症例においても、原発巣の浸潤部では紡錘形を呈するのにに対し、転移巣では上皮様の形質を有する細胞が腫瘍を形成していた(*J Oral Pathol Med*, 2006.; *J Oral Pathol Med*, 2011.)。

これらの知見より、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系というよりは、EMTやMETを包括した *in vivo* で転移巣を高頻度で形成するマウスモデルの作成を行い、研究を進めていくことが必要であると考えた。従来のモデルは主にDMBAの塗布による化学発癌モデルであり、転移機構の解明には適さないと考えられる。

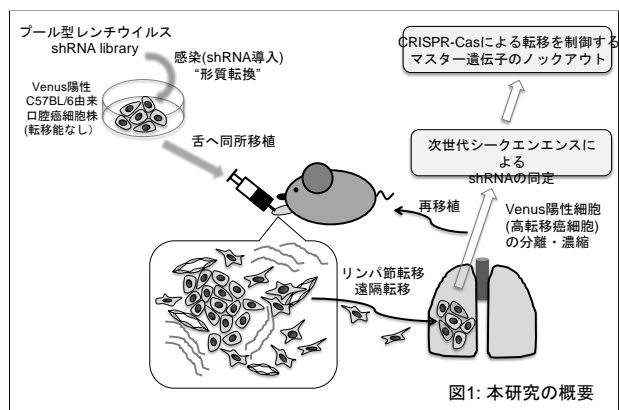
2. 研究の目的

上述のように、*in vivo* で転移巣を高頻度で形成するマウスモデルの作成にチャレンジし、口腔癌の病態解明や新規治療薬開発への応用につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでに我々が用いてきた *in vivo* モデルである口腔扁平上皮癌異種同所移植を改良することを考えた。異種同所移植はヒト口腔扁平上皮癌細胞株をヌードマウスの舌に移植するもので(図)、頸部リンパ節転移や肺転移を評価できる良い実験系である。問題点としては、異種移植であるため、ヌードマウスを用いるの必要があり、腫瘍免疫系と転移との関連がみることができない点である。そこで本研究では、C57BL/6 マウス由来口腔扁平上皮癌細胞株であるHNM007細胞(Oncogene, 2004)を、C57BL/6 マウスの舌に同種同所移植することで、免疫系の関与も含めてみることでできるモデルを作成することを考えた。

まずHNM007細胞に蛍光タンパクを発現するベクターを遺伝子導入し、安定性に蛍光タンパクを発現する細胞株を作製する。さらにこの細胞株をC57BL/6マウスの舌に同種同所移植し、経時的に観察し、適切な移植条件を検討する。さらに、この細胞株にlentivirusによりshRNA libraryの導入を行い、肺またはリンパ節の転移巣より腫瘍細胞を分離し、DNAを抽出、シーケンスすることで腫瘍の転移に抑制的に働いている遺伝子を同定する。CRISPR-Cas9またはshRNAによって、その遺伝子の発現を安定性に抑制したHNM007細胞を作成し、高転移マウス由来口腔扁平上皮癌細胞株を作製する。



4. 研究成果

まず、C57BL/6 マウスへの同種同所移植をいくつかの C57BL/6 由来癌細胞株を用いて検討した。具体的には上述の HNM007 及び併せて分与された AKR 細胞(Oncogene, 2004)、加えて極めて高い造腫瘍能を有するメラノーマ細胞株である B16F10 細胞を用いた。In vitro の観察において、HNM007 細胞は多角形の上皮様細胞で敷石状に増殖していた。一方、AKR 細胞は紡錘形を呈しており、EMT の特徴を有していると考えられた。これらの細胞を C57BL/6 マウスの舌へ移植を行ったところ、いずれの細胞株も腫瘍を形成したが、AKR 細胞及び B16F10 細胞においては腫瘍の増大が顕著で、餌を捕食できなくなってしまう、移植後 2 週間までにはほとんどの個体が死亡した。転移の有無を確認すると、B16F10 細胞では多数のリンパ節転移がみられたが、AKR 細胞では明らかではなかった。HNM007 細胞では全個体が生存していたが、転移は明らかではなかった。早期に死亡してしまうため、AKR 細胞は本研究に不適当と考えられ、HNM007 細胞が妥当であると考えられた。

次に蛍光タンパクを安定性に発現する HNM007 細胞の作製に取り組んだ。レンチウイルスベクター (pCS II-CMV-IRES-Venus:理化学研究所 三好博士より供与)を用いた。本ベクターは CMV プロモーターを有しており、強い発現が得られる。また IRES(internal ribosome entry site)を有しており、CMV プロモーターの下流に何らかの遺伝子を発現すると、その遺伝子が発現している状況下では IRES の下流の蛍光タンパク Venus(GFP の変異体で pH の影響を受けにくく、強い蛍光が得られる)が同時に発現するよう設計されている。そこで、将来的に in vivo イメージングにも応用できるよう、Firefly ルシフェラーゼ遺伝子を同ベクターにクローニングし、安定性にルシフェラーゼと Venus を同時に発現する細胞株の作製を試みた。方法としては作成したレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスを産生し、HNM007 細胞に感染させた。一週間培養を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ多くの細胞で強い蛍光が得られた。中には蛍光の弱い細胞や蛍光を発していない細胞も散見されたため、セルソーティングを行い、傾向の強い集団を分離した。また分離培養した細胞を溶解し、ルシフェリンを加えたところ、強い蛍光が測定された。

上述のように作製したルシフェラーゼと蛍光タンパク Venus を安定性に発現する細胞株を C57BL/6 マウスの舌へ移植したところ、腫瘍形成を認めた。移植後、約 2 週間の間にはすべての個体は生存しており、明らかなリンパ節転移や肺転移は認めなかった。以上より、当初の計画から多少の変更はあったが、腫瘍形成能は有するが、転移能は低い細胞株でかつ、ルシフェラーゼや蛍光タンパクを安定性に発現する細胞株の作製を行うことができた。ただし、本研究の研究期間内に shRNA library を用いた in vivo スクリーニングには至らなかった。すでに shRNA library は取得済みであり、研究期間は終了したが、引き続きスクリーニングを進めていく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. Siriwardena SBSM, **Tsunematsu T**, Qi G, Ishimaru N, **Kudo Y**. Invasion-Related Factors as Potential Diagnostic and Therapeutic Targets in Oral Squamous Cell Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci*. 2018 May 14;19(5). Pii:E1462. doi: 10.3390/ijms19051462. 査読有
2. Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacham K, **Tsunematsu T**, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit P, Thuwajit C, **Kudo Y**. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblast promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 Jan 18;17(1):10. doi: 10.1186/s12943-018-0760-x. 査読有
3. Qi G, Liu J, Mi S, **Tsunematsu T**, Jin S, Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, **Kudo Y**. Aurora Kinase Inhibitors In Head And Neck Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(3):199-213. doi: 10.2174/1568026618666180112163741. 査読有
4. Kujiraoka S, **Tsunematsu T**, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, Tanaka M, Kobayashi Y, Kondo T, Ushio A, Otsuka K, Kurosawa M, Saito M, Yamada A, Arakaki R, Nagai H, Nikai H, Takeuchi K, Nagao T, Miyamoto Y, Ishimaru N, **Kudo Y**. Establishment and characterization of a clear cell

odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. *Oral Oncol.* 2017 Jun; 69:46-55. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.04.003. 査読有

5. Ando T, Kudo Y, Iizuka S, Tsunematsu T, Umehara H, Shrestha M, Matsuo T, Kubo T, Shimose S, Arihiro K, Ogawa I, Ochi M, Takata T. Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma. *Sci Rep.* 2017 Jan 5;7:40187. doi: 10.1038/srep40187. 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 常松貴明、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、小川博久、常山幸一、石丸直澄，DNA ライセンシング因子 CDT1 の新規ユビキチン分解機構とその意義の解明，第 107 回日本病理学会総会、2018 年
2. 梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄，口腔癌における Periostin スプライシングバリエーションの同定とその役割，第 107 回日本病理学会総会、2018 年
3. 常松貴明、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄、工藤保誠，タンパク質のユビキチン分解を介した細胞周期と分化の制御機構，2017 年度生命科学系合同年次大会 (ConBio2017)，2017 年
4. 常松貴明、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄，多能性幹細胞におけるユビキチンプロテアソーム経路による未分化性維持機構，第 59 回日本歯科基礎医学会学術大会、2017 年
5. Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru, Yasusei Kudo, Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/C-Cdh1 ubiquitin ligase and maintains pluripotent stem cells, Gordon research conference 2017, Cell Growth and Differentiation, 2017 年
6. 梅田将旭、常松貴明、斉藤雅子、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄，口腔癌における Periostin スプライシングバリエーションの新たな役割，第 106 回日本病理学会総会、2017 年
7. 常松貴明、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、常山幸一、石丸直澄，胎児性癌におけるユビキチンプロテアソーム経路による未分化性維持機構，第 106 回日本病理学会総会、2017 年

〔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：

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：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：工藤 保誠
ローマ字氏名：(KUDO, Yasusei)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部(歯学域)
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50314753

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：石丸直澄
ローマ字氏名：(ISHIMASU, Naozumi)

研究協力者氏名：新垣 理恵子
ローマ字氏名：(ARAKAKI, Rieko)

※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。