

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14414

研究課題名(和文) CD271を標的とした扁平上皮癌に対する分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Validation of CD271 as a Therapeutic Target of Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

田中 伸幸 (TANAKA, NOBUYUKI)

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・部長

研究者番号：60280872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：扁平上皮癌のがん幹細胞マーカーとして同定したCD271に着目し、CD271を標的とした治療法の開発に取り組んだ。腫瘍形成には、CD271が必要であった。細胞周期はG0にアレストした。シグナル伝達系ではp42/44ERKが減少していた。エフェクター分子と目されるRhoAに対する阻害を行ったところ細胞遊走が抑制された。ERK阻害薬を添加したところ、細胞増殖を著明に抑制した。一方、in vitroにおける抗体の阻害効果は有意ではなかった。以上の結果から、CD271のシグナル伝達系を標的とした治療が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to validate a potential of CD271 as a squamous cell carcinoma target, CD271 was knock-downed by shRNA. CD271 inhibition inhibited both cell proliferation and migration. p42/44Erk inhibition as well as RhoA inhibition inhibited malignant phenotypes of HPCM2 cells. On the other hand, an anti-CD271 Ab did not show significant in vitro effect on the same cells. Together, CD271 is shown to be a potential target for squamous cell carcinoma therapy.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：がん

1. 研究開始当初の背景

肺扁平上皮癌・食道癌および頭頸部癌などは、進行がんとして診断される症例が多く、治療に難渋する症例が多い。手術不能症例および再発症例では CDDP 等の抗癌剤および放射線治療が選択されるが、生命予後は不良である。効果的な治療法開発のためには適切な標的が必要となるが、扁平上皮癌には明確なドライバー変異がないことが多いため、治療標的が絞れないままであった。新たな観点からのアプローチが急務であり、効果的な治療法開発が期待されていた。

(2)上記の状況を踏まえ、頭頸部がん患者由来組織を用いてセルソーターによる癌亜集団の解析を開始した。CD44,CD90 等の癌幹細胞マーカーに着目して細胞を分取し、超免疫不全マウス (NOG) に移植した (腫瘍形成能スクリーニング)。その結果、CD271 が下咽頭癌 (頭頸部癌) のがん幹細胞マーカーであることを世界に先駆けて見出した (*PLoS ONE*, 2013)。実際に頭頸部癌症例における CD271 発現と患者予後を調べたところ、両者の間には明確な関連性があった。

(3)CD271 を発現する癌細胞は、①治療抵抗性、②転移、③再発、の3点において従前の「癌幹細胞理論」によく合致する。一方、CD271 陽性細胞は浸潤部に集まる性質を持ち、MMP 等の浸潤関連蛋白を高発現していた。次いで、肺扁平上皮癌および食道癌を調べたところ、いずれも CD271 高発現症例は予後不良であった。CD271 発現を人為的に上昇させると悪性度が増すが、ノックダウンによって腫瘍消失が認められた。これらの事実は CD271 が難治性扁平上皮癌の治療標的として有望であることを示唆すると考えられた。

2. 研究の目的

(1)CD271 は扁平上皮癌の悪性度を反映する優れたマーカーであるとともに機能分子として悪性形質発現を制御することから、CD271 自体が有望な治療標的となるという仮説を立て、これを明らかにすることを目的とする。立証にあたり、下記3点に挑むことで計画の達成を図る。

(2)CD271 が扁平上皮癌を悪性化する機能ドメインとエフェクター分子について解析し、責任分子の性状を明らかにする。

(3)CD271 の細胞内機能ドメインを阻害することで治療効果が発揮されるかを明らかにする。

(4)抗 CD271 抗体の樹立をする。樹立できた場合には癌形質の阻害効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 造腫瘍形成に必要な CD271 の機能ドメインの同定と治療効果の検定。腫瘍形成に重要な CD271 の細胞内ドメインを同定するため、CD271 変異体を用いて腫瘍形成等を調べる。

(2)CD271 シグナル伝達に必要なエフェクター分子の同定：CD271 のシグナル伝達分子、特に腫瘍形成に関わる分子は不明であることから、シグナル伝達に関する責任分子を同定する。一方、リコンビナント CD271 を調整し会合分子のスクリーニングを行う。

(3)CD271 シグナルのうち siRNA を用いて CD271 をノックダウンし、MAPK(ERK), JNK および p38 等のシグナルに対する影響を調べる。さらに、RhoA に関する関連性を明らかにするため TAT-Pep5 ペプチドを用いて同経路の阻害を行い、細胞増殖、scratch アッセイや transwell migration アッセイなどを用いて細胞遊走などの悪性形質に変化について明らかにする。さらに ERK に着目し、その阻害を行う。遺伝子発現の比較をマイクロアレイによって明らかにする。

(4)細胞周期に関する関連性を明らかにするため、FACS による細胞周期解析を行う。さらに細胞周期関連遺伝子との関連を明らかにする。

(5)抗 CD271 抗体の樹立：マウスに対し CD271 ペプチドを免疫し、ハイブリドーマを調整する。スクリーニングを実施し特異抗体の樹立を行う。もし抗体が得られた場合は、腫瘍増殖阻害などの効果をみる。得られない場合は、市販抗体を用いて増殖阻害活性を調べる。

4. 研究成果

(1)腫瘍形成に関わる細胞内ドメインの同定 細胞内ドメインを全部欠損した変異体を扁平上皮癌細胞である HPCM2 に導入した。細胞増殖の低下傾向があったが有意差はなかった。この原因として既存の CD271 が十分に発現していることが想定された。

(2)CD271 会合分子の同定 CD271 の細胞質内領域についてリコンビナント蛋白を調整した。これを Beit として、細胞可溶化液から会合分子を精製し TOF-MS 法により同定した。その結果、Vps 蛋白等の複数の会合候補分子が捕捉された。これらの中

には細胞内輸送に関連する因子も含まれていたため、CD271 の発現調節には輸送による調節が存在することが示唆された。

(3)CD271 ノックダウンは腫瘍増殖を著明に低下させる

shRNA 発現ベクターを導入することによって HPCM2 株の CD271 を安定的にノックダウンすることに成功した。この細胞は著明に細胞増殖が抑制されており、シグナル伝達系を解析したところ、MAPK(ERKp42/44)が減少していた。ERK 阻害薬 U0126 を添加したところ、細胞増殖は著明に抑制された。したがって ERK 経路は CD271 抑制による増殖阻害に関連する可能性が高いと考えられた。

(4)CD271 シグナルの阻害は細胞遊走を阻害する

CD271 ノックダウンは細胞遊走を著明に抑制した。さらに、RhoA に対する阻害を行ったところ細胞遊走が抑制された。したがって、RhoA 阻害は CD271 による細胞遊走に関与する可能性が高いと考えられた。

(5)CD271 は細胞周期を停止させ G0 アレストを誘導する

CD271 ノックダウンにより細胞周期が G0 にアレストした。さらに、G0 アレストに重要な CDKN1C が発現上昇していた。CDKN1 のノックダウンを更に行ったところ、G0 アレストが部分的に解除された。したがって、CD271 の下流シグナルは複数存在し、細胞増殖と細胞遊走を別個に制御していることが示唆された。この事実は CD271 が癌治療の標的であることを強く示唆していると考えられた。

(5)CD271 抗体による扁平上皮癌の細胞増殖は不十分である

CD271

特異抗体の作成についてマウスにリコンビナント蛋白の免疫を行い、ハイブリドーマ作成を行ったが、有益な抗体は得られなかった。このため、市販抗体を用いた in vitro 細胞増殖抑制試験を行った。細胞増殖は有意な阻害を受けておらず、今後新たなエピトープ特異性を有する抗体開発が必要と思われる。本研究では in vivo 実験系の樹立には至らなかったが、今後抗腫瘍免疫を誘導できる抗体が得られる可能性が残ると考えられた。

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 8 件)

①Oshima R, Hasegawa T, Tamai K, Sugeno N,

Yoshida S, Kobayashi J, Kikuchi A, Baba T, Futatsugi A, Sato I, Satoh K, Takeda A, Aoki M & Tanaka N

② “ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways”
Scientific Reports 6, 24997 (2016)
doi:10.1038/srep24997

③ Watanabe K, Fukuhara T, Tsukita Y, Morita M, Suzuki A, Tanaka N, Terasaki H, Nukiwa T, Maemondo M.
“EGFR Mutation Analysis of Circulating Tumor DNA Using an Improved PNA-LNA PCR Clamp Method”
Can Respir J. 2016;2016:5297329. doi: 10.1155/2016/5297329.

④ Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M.
“Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription”
Nat Commun. 2016 7:11624. doi: 10.1038/ncomms11624.

⑤ 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 cells”
Scientific Reports 6, Article number: 30707. (2016) doi: 10.1038/srep30707

⑥ Maejima R, Tamai K, Shiroki T, Yokoyama M, Shibuya R, Nakamura M, Yamaguchi K, Abue M, Oikawa T, Noguchi T, Miura K, Fujiya T, Sato I, Iijima K, Shimosegawa T, Tanaka N, Satoh K.
“Enhanced expression of semaphorin 3E is involved in the gastric cancer development”
Int J Oncol. 2016;49:887-94. doi: 10.3892/ijo.2016.3593.

⑦ Yamaguchi K, Takanashi T, Nasu K, Tamai K, Mochizuki M, Satoh I, Ine S, Sasaki O, Satoh K, Tanaka N, Harigae H. & Sugamura K.

“Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant AKT activation”

Cancer Sci. 107, 638-643, 2016. doi: 10.1111/cas.12921.

⑧ Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M.

“Induction of Cell Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax”

PLoS One, 11:e0148217(2016).

[学会発表] (計 4 件)

① Tanaka N, Imai T, Mochizuki M, Sugawara, S, Tamai K, Yamaguchi K, Satoh K, and Sugamura K.

CD271 defines a cancer initiating cell population in hypopharyngeal cancer AACR2015, 2015 年 4 月 18 日-22 日 ペンシルバニア州フィデルフィア(アメリカ合衆国)

② 望月麻衣、今井隆之、玉井恵一、本橋ほづみ、田中伸幸. CD271 marks cancer initiating cells in hypopharyngeal carcinoma with enhanced proliferation potential. 第 7 4 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 名古屋市

③ 望月麻衣、玉井恵一、小鎌直子、中村真央、松浦一登、山口壹範、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 3 9 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日 横浜市

④ Fukushima, M Nagashima R, Motohashi H, Tanaka, N. Nrf2 plays a pivotal role in Staphylococcus aureus infection through NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. 日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日-7 日 沖縄県宜野湾市

[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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()