

令和元年5月15日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20290

研究課題名(和文) CD271による下咽頭がん増殖制御機構の解明と標的治療への応用

研究課題名(英文) CD271 is a functional and therapeutic-targetable marker of cell proliferation in hypopharyngeal cancer.

研究代表者

望月 麻衣 (Mochizuki, Mai)

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)・がん幹細胞研究部・研究技師

研究者番号：40726303

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)：我々は、表面分子CD271が下咽頭癌において癌浸潤部に強く発現し、予後との相関性を持つ悪性度マーカーであることを報告しているが、癌におけるCD271の働きについての検討は不十分だった。本研究では、下咽頭癌におけるCD271の働きを明らかにするため、siRNAを用いたCD271ノックダウン細胞を樹立した。結果、CD271は増殖能および造腫瘍能を制御しており、ノックダウンによって静止期の誘導とCDKN1C分子の発現上昇が観察された。また、CD271はRhoAを介した細胞遊走能も制御しており、複数の経路を介して下咽頭がんの悪性度に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来有望な治療標的に乏しかった下咽頭癌に焦点を当て、CD271という分子が癌の増殖・遊走能の制御に關与することを新規に見出した。さらに、申請者はCD271の下流で細胞周期制御分子であり、がん抑制因子としても知られるCDKN1Cが抑制されることを見出しており、癌の悪性化の要因の一つである可能性を示した。これらの結果は、CD271を標的とした治療の有望性を示しており、今後さらに研究を進めることで新規治療法の開発に弾みがつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that CD271 (p75 neurotrophin receptor) is expressed in invasive front and a marker for tumor formation and is correlated with a poor prognosis in human hypopharyngeal cancer (HPC). To elucidate the role of CD271 in HPC, we established HPC cell lines and CD271-knockdown cells using siRNA. We found that CD271-knockdown completely suppressed the cells' tumor-forming capability both in vivo and in vitro. CD271-knockdown induced cell-cycle arrest and CDKN1C expression, whereas suppressed ERK phosphorylation. In addition, either CD271 depletion diminished the in vitro migration capability. Collectively, CD271 initiates tumor formation by increasing the cell proliferation capacity through CDKN1C suppression and ERK-signaling activation, and by accelerating the migration signaling pathway in HPC.

研究分野：頭頸部がん

キーワード：下咽頭癌 CD271

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

1. 研究開始当初の背景

増殖因子受容体の過剰発現・変異は、がん細胞の過剰増殖を引き起こす。例えば、肺がんにおいては EGFR の変異が有名であるが、これに対する特異的抗体セツキシマブの使用によって、治療効果は向上した。

頭頸部がんは、近年罹患率の上昇が認められている極めて悪性度の高いがんである。診断時既に進行がん (ステージ III, IV) である症例が 60% を占め、シスプラチン・5-FU を用いた化学放射線療法でも治療効果に乏しい。近年、セツキシマブが使用されはじめたが、満足のいく奏功率は得られておらず、さらなる標的分子の探索が必須である。

下咽頭がんの有効な治療標的とは何か? 申請者は、他がん種で研究されている「増殖因子受容体」に着目し、下咽頭がん臨床検体を用いて免疫不全マウスへの腫瘍形成能を元にスクリーニングを行った。その結果、神経成長因子(NGF)の受容体である CD271 が候補として挙げられた。解析の結果、CD271 陽性細胞は造腫瘍能が高く(表 1)、CD271 の発現は患者予後と関連し(図 1)、CD271 は下咽頭がん Tumor initiating cells マーカーであることを世界に先駆けて見出した(PLoS ONE, 2013)。

引き続き申請者は、CD271 ががん細胞を直接制御する可能性を検討した。CD271 をノックダウンすると、in vitro における増殖・マウスにおける造腫瘍能、いずれもほぼ完全に失われた。細胞周期解析では、CD271 ノックダウン細胞は大部分が G0 期で停止していた。マイクロアレイによる網羅的解析を行ったところ、G0 期維持に重要な分子である CDKN1C が著明に変動していた。下咽頭がん手術検体においても、CD271 陽性細胞は増殖性の細胞 (Ki67 陽性) であることが確認できた。

以上の結果から、CD271 は下咽頭がんの細胞増殖を制御していると考えられた。これまでの研究では、CD271 は、正常神経細胞では細胞死と細胞生存という一見して正反対の生理活性を有することが報告されている。一方、がんにおいては悪性黒色腫や食道がんの Tumor initiating cells マーカーとしての報告があるものの、CD271 の分子基盤の解明はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

本課題では、頭頸部がんにおける CD271 の機能解析を進めると共に、治療標的分子としての可能性を追求する。具体的には、CD271 が制御する下流シグナルはなにか? CD271 を阻害することで、治療効果を発揮するか? の 2 点を検討する。

3. 研究の方法

CD271 下流シグナルの同定

増殖制御に重要なリガンド依存性下流シグナルを決定する。

腫瘍形成能に重要なドメインを決定し、その会合分子を同定する。

申請者が同定した標的遺伝子 CDKN1C の、CD271 による制御機構を解析する。

CD271 阻害による治療効果の検討

抗 CD271 阻害抗体を作成し、細胞増殖阻害効果を基準にスクリーニングを行う。

作成した阻害抗体が抗腫瘍効果を発揮することを、下咽頭がん in vivo モデルで立証する。

4. 研究成果

(1) CD271 は下咽頭がんにおいて造腫瘍能・増殖能を制御する

下咽頭がん臨床検体における免疫染色の結果、正常上皮基底層において CD271 陽性細胞は Ki67 陰性の非増殖性の細胞であり、軽度異形成から上皮内癌、扁平上皮癌に移行するにしたがって Ki67 陽性の増殖性の細胞の割合が上昇することが判明した。さらに、下咽頭がん細胞株の CD271 ノックダウンにより、増殖性、造腫瘍能が失われることが判明し、CD271 は増殖性の細胞を規定するだけでなく自身が増殖を制御する機能性因子であることが分かった。

(2) CD271 ノックダウンによって G0 期が誘導される

独自に樹立した下咽頭がん細胞株を用いて、CD271 を siRNA でノックダウンした結果、細胞周期が顕著に静止期 (G0 期) で停止することが判明した。マイクロアレイ解析を行ったところ、細胞周期に関連するパスウェイが大きく変動しており、また WAD 法解析によって静止期制御因子である CDKN1C 分子が一番大きく動いていることが分かった。CD271 と CDKN1C を同時にノックダウンすることで G0 期への誘導が一部解除されたことから、CD271 は CDKN1C を制御して細胞増殖の停止を解除していることが示唆された。

(3) CD271 は RhoA を介して細胞遊走を制御する

臨床検体の免疫染色の結果から、CD271 は特に invasive front に強く発現していた。このことから、CD271 が細胞浸潤に関与するという仮説を立てた。スクラッチアッセイおよび migration assay の結果から、CD271 ノックダウンによって著しく細胞遊走能が抑制されることが判明し、CD271 によって活性化を受ける細胞骨格制御分子 RhoA の阻害剤によっても、細胞遊走は低下することが判明した。これらの結果から、CD271 は RhoA の活性化を介して下咽頭がんの浸潤に寄与することが示唆された。

以上の結果は、*Scientific Reports* (2016)にて報告をした。

(4) 抗 CD271 抗体産生ハイブリドーマの樹立

昆虫細胞を用いてリコンビナント CD271 タンパクを発現・精製し、独自のドメインを認識するハイブリドーマを複数株樹立した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Mochizuki, M., Tamai, K., Imai, T., Sugawara, S., Ogama, N., Nakamura, M., Matsuura, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Sato, I., Motohashi, H., Sugamura, K. and Tanaka, N. (2016). "CD271 regulates the proliferation and motility of hypopharyngeal cancer cells." *Scientific Reports* 6: 30707.
2. Yamaguchi, K., Takanashi, T., Nasu, K., Tamai, K., Mochizuki, M., Satoh, I., Ine, S., Sasaki, O., Satoh, K., Tanaka, N., Harigae, H. and Sugamura, K. (2016). "Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant AKT activation." *Cancer Science* 107(5): 638-643.
3. Katayama, H., Tamai, K., Shibuya, R., Nakamura, M., Mochizuki, M., Yamaguchi, K., Kawamura, S., Tochigi, T., Sato, I., Okanishi, T., Sakurai, K., Fujibuchi, W., Arai, Y. and Satoh, K. (2017). "Long non-coding RNA HOTAIR promotes cell migration by upregulating insulin growth factor-binding protein 2 in renal cell carcinoma." *Scientific Reports* 7(1): 12016.
4. Fujisaka, Y., Iwata, T., Tamai, K., Nakamura, M., Mochizuki, M., Shibuya, R., Yamaguchi, K., Shimosegawa, T. and Satoh, K. (2018). "Long non-coding RNA HOTAIR up-regulates chemokine (C-C motif) ligand 2 and promotes proliferation of macrophages and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma cell lines." *Oncology Letters* 15(1): 509-514.
5. Shimoyama, Y., Tamai, K., Shibuya, R., Nakamura, M., Mochizuki, M., Yamaguchi, K., Kakuta, Y., Kinouchi, Y., Sato, I., Kudo, A., Shimosegawa, T. and Satoh, K. (2018). "Periostin attenuates tumor growth by inducing apoptosis in colitis-related colorectal cancer." *Oncotarget* 9(28): 20008-20017.
6. Okazaki, T., Tamai, K., Shibuya, R., Nakamura, M., Mochizuki, M., Yamaguchi, K., Abe, J., Takahashi, S., Sato, I., Kudo, A., Okada, Y. and Satoh, K. (2018). "Periostin is a negative prognostic factor and promotes cancer cell proliferation in non-small cell lung cancer." *Oncotarget* 9(58): 31187-31199.

〔学会発表〕(計 4 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 “頭頸部がんにおいて CD271 は増殖・浸潤を制御する” 第 39 回分子生物学会年会 (2016)
2. 望月麻衣、今井隆之、松浦一登、山口壹範、玉井恵一 “下咽頭がんにおいて CD271 は増殖・浸潤を制御する” 先端動物モデル支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 (2017)
3. 望月麻衣、中村真央、渋谷莉恵、山口壹範、佐藤賢一、菅村和夫、玉井恵一 “肺扁平上皮癌の増殖は CD271 依存性である” 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018)
4. Mai Mochizuki, Mao Nakamura, Rie Shibuya, Kazunori Yamaguchi, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh, Keiichi Tamai “Lung squamous cell carcinoma exclusively depends on CD271 for cell proliferation.” *Mechanisms & Models of cancer* (2018)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：今井隆之
ローマ字氏名：Imai Takayuki

研究協力者氏名：松浦一登
ローマ字氏名：Matsuura Kazuto

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。