

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20594

研究課題名(和文) 骨髄播種癌細胞の休眠状態に基づく口腔癌の転移再発メカニズム解明と新規治療法の創出

研究課題名(英文) Elucidation of the metastasis mechanism of oral cancer and development of the new therapeutics based on tumor dormancy of bone marrow-disseminated tumor cells

研究代表者

中村 拓哉 (Nakamura, Takuya)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80761212

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)：骨髄に播種された骨髄播種癌細胞(BM-DTC)は、休眠状態で通常の治療法に抵抗性を示し、その存在は転移性再発の強力な危険因子である。我々は骨髄に播種されたBM-DTC株を樹立し、それが増殖抑制状態、抗癌剤耐性を有しており、それらの性質にSDF1-CXCR4-TGF- β 2シグナルが関与していることを明らかにした。BM-DTCはマイクロアレイ解析において親株は違う特徴的な遺伝子発現をしていた。また、骨髄環境で癌細胞が生存するためには、高Src活性が重要と言われているが、BM-DTC株も高いSrc活性を有していた。今後のBM-DTCの更なる性質の解明ががんの休眠状態及び微小残存腫瘍の性質解明に寄与する。

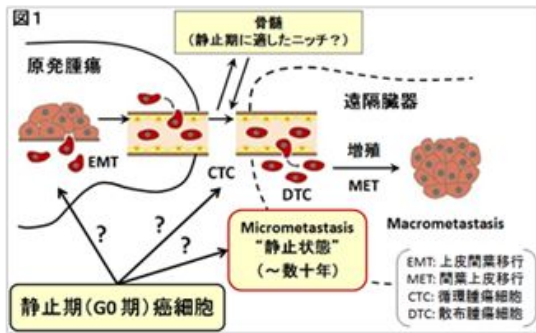
研究成果の概要(英文)：Dormant disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) are resistant to conventional therapy in cancers including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). This study aimed to elucidate intrinsic molecular characteristics in BM-DTC. We used the human HNSCC cell line HEp3-originated sublines [i.e. parental line (P-HEp3), BM-DTC-derived (BM-HEp3), and lung metastases-derived sublines (Lu-HEp3)]. We revealed that the TGF- β 2-SDF-1-CXCR4 signaling axis was crucial for drug resistance dependent on a slow-cycling state in BM-DTC but not in lung metastatic cells. Our analyses revealed that slow-cycling and drug-resistant BM-HEp3 cells had unique gene expression signatures. In addition, our investigation for phosphorylation of 39 kinases associated with tumor progression showed enhanced activation of only Src in BM-HEp3 compared with P- and Lu-HEp3. Further studies should contribute to better understanding of biology of tumor cell dormancy and minimal residual disease in BM.

研究分野：口腔外科

キーワード：休眠状態 骨髄播種癌細胞 抗癌剤耐性 骨髄環境 TG- β 2 増殖抑制状態

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡のほとんどは転移・再発を原因とする。そして、癌細胞が明らかな病変を形成する以前の無症候性かつ検出不可能な期間を「Tumor dormancy (がんの休眠状態)」と呼ぶ。そのような休眠状態に保たれた腫瘍細胞が、なんらかの要因により増殖開始することで致命的な再発や転移に至る (Aguirre-Ghiso, Nat Rev Cancer 2007)。したがって、tumor dormancy のメカニズムの解明とその制御が癌治療における最重要課題のひとつと考えられている。



また、腫瘍進展の早期より癌細胞は播種癌細胞 (Disseminated tumor cell: DTC) として全身に散布されていることが知られている。興味深いことに様々な癌種の患者において、DTCs に起因する「微小残存腫瘍」が骨髄 (Bone marrow: BM) において高頻度に観察される (Aguirre-Ghiso, Nat Rev Cancer 2007)。骨髄穿刺液中に認められる DTCs は、そのほとんどが増殖マーカー (Ki-67 など) 陰性であるにも関わらず (Klein, Curr Opin Genet Dev 2010)、手術時や治療終了の時点における BM-DTCs の多さは、その後の無転移生存率の減少と密接に関連している (Partridge et al. Clin Cancer Res. 2003)。注目すべきことに、この統計学的な関連性は、骨転移を来すことが比較的稀な頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) などの癌種においても共通して認められる (Gath et al. Cancer Metastasis Rev. 1999)。

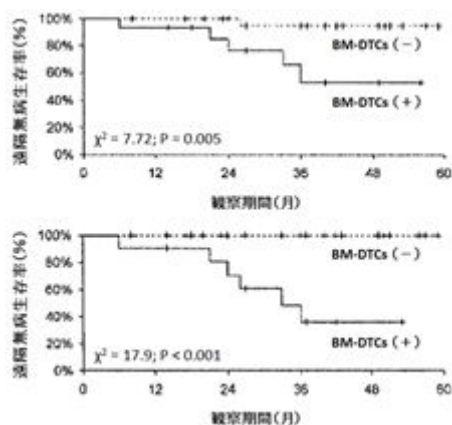


図2 OSCC患者 BM-DTCs と予後との関連
これらの知見から、BM-DTCs はある一定の期間、機能的に細胞周期が静止した“休眠状

態 (Tumor Dormancy)”を維持しており、なんらかのきっかけにより転移巣の形成を開始すると考えられる。さらに、BM は他の臓器での転移・再発を引き起こすような癌細胞の供給源となっていると考えられている。このような休眠状態にある微小残存腫瘍は、現状では臨床的に検出することが不可能である。以上の理由から、BM-DTCs の検出や制御が癌の治療を目指すにあたって極めて重要である。

2. 研究の目的

申請者は休眠状態もしくは増殖抑制状態にある BM-DTCs の特異的性質を解明するために、BM および肺の DTC に由来する細胞株をそれぞれ樹立した。HNSCC 細胞である HEp3 細胞は、マウスや鶏卵モデルにおいて多臓器転移を呈するが、骨転移は形成せず、BM に播種した HEp3 細胞は、HNSCC 患者の臨床象を反映するように、ほぼ 100% 休眠状態を保つことが知られている。HEp3 細胞をマウスの皮下に移植し、移植部位から分離した HEp3 細胞を親株として P-HEp3 と名付けた。また一方で、BM および肺からそれぞれ DTCs を分離した。それら 2 種類の DTCs をそれぞれディッシュ上で培養し、再度それぞれをマウスの皮下に移植した。これらのマウス皮下移植から DTCs 分離の過程は、5 回繰り返し行った。5 回目の移植の際に BM、肺から分離した DTCs を、BM-HEp3、Lu-HEp3 と名付けた。これらの 3 株を比較することで、BM-DTC 特有の性質の解明を試みた。

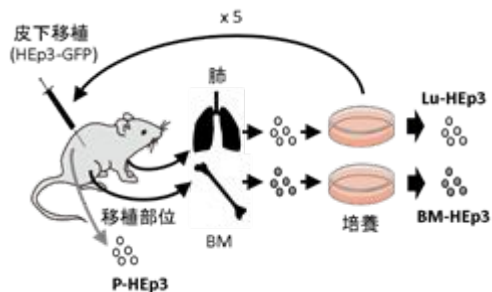


図3 BM-DTCs 株、Lu-DTCs 株の作製過程
その中で、BM-HEp3 細胞株が、他の二株より、増殖抑制状態でありなおかつ抗癌剤耐性であることを見出した。さらに BM-HEp3 のそのような性質は、BM-DTC 自身が有する CXCR4-SDF-1-TGF β 2 のポジティブフィードバック機構によって制御されていること突き止めた (Nakamura et al. Oncotarget 2015)。今後 BM-DTCs や転移細胞の自律的性質と微小環境要因の統合的な理解を通して、休眠状態にある微小残存腫瘍に対する新規診断・治療法の開発に期待が持てる。

3. 研究の方法

【1. BM-DTCs と親株の性質の違いを規定している因子の同定】

【a. BM-DTC の癌幹細胞形質の検討】

申請者は、骨髄において休眠状態を保つという実際の臨床を反映した OSCC 細胞株である

HEp3細胞を用いてBM-DTC株(BM-HEp3)及びLu-DTC株(Lu-HEp3)を樹立することに成功した。この、BM-HEp3は、増殖抑制状態であり抗癌剤耐性を有していることが判明しており、そのような性質の制御にはCXCR4-SDF-1-TGF- β 2シグナルが大きく関与していることを報告した。BM-DTCsが有する増殖抑制状態、抗癌剤耐性、間葉系性質の獲得といった悪性性質は、癌幹細胞に近い性質ではないかと考えた。そこで、癌幹細胞系マーカーやその他マーカーをリアルタイムPCRにて検討し、Sphere assay法、ALDH活性酵素測定によって、BM-HEp3が癌幹細胞形質を有した細胞であるのかを検討した。

【b. 網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)による変動因子の解析】

申請者は、樹立したBM-HEp3、Lu-HEp3、P-HEp3を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、興味深いことにP-HEp3とLu-HEp3は非常に似た発現プロファイルを示す一方で、BM-HEp3においては、他の2株と大きく異なる発現プロファイルを示すことが明らかとなった。そこでBM-HEp3において発現変動が大きかった因子に着目し、BM-DTCsにおける静止期維持や抗癌剤耐性といった悪性形質にどのように関わるか検討した。また、BM-DTCsの発現プロファイルは、乳がんのエストロゲン陽性タイプの乳がんや乳がんの骨再発巣と非常に似た発現プロファイルを示した。エストロゲン陽性タイプの乳がんは近年癌の休眠状態に深く関与していることが報告されている(Ogba et al, Breast Cancer Res 2014. Kim et al, PLoS One 2012.)。このことから、申請者はエストロゲンレセプター阻害剤を用いることによって、BM-DTCsにおける静止期維持や抗癌剤耐性といった性質がどのように変動するか検討を行った。

【c. CXCR4及びTGF- β 2の高発現の骨髄への播種、生着への関与の解析】

原発巣の中に含まれる細胞集団の中で、CXCR4及びTGF- β 2の発現が高い細胞群が骨髄に播種されやすく、尚且つ骨髄に生着しやすいのか検討を行う。まず、初めにP-HEp3をCXCR4やTGF- β 2に長期間暴露させ続けて、BM-HEp3と同じような性質を示すようになるのか検討した。

【2. In vivoにおけるBM-DTCsの抗癌剤耐性機構、転移機構の詳細な解析】

申請者の仮説では、骨髄において休眠状態に保たれているBM-DTCが、肺などに転移することによって転移を成立させていると考えている。そこで、直接骨髄内にBM-HEp3を移植し、生着可能かどうか、肺に転移を成立させるのかどうかをP-HEp3と比較しながら検討を試みた。マウス大腿骨内に直接HEp3細胞の移植を行い、数週間後に、肺に転移した細胞の数、または骨髄に生着している細胞の数の検討を試みた。また同時にCXCR4阻害剤投与群を作り、CXCR4阻害によって肺転移、骨髄への生着が抑制されるのか検討の予定

であった。

【3. 患者サンプルより抽出したCTCの解析による、BM-DTCとの共通点の検討】

熊本大学歯科口腔外科学分野で治療を行ったOSCC患者の血液サンプルを用いて、血中を循環しているCTCの分離を試みた。そのCTCを培養しその性質を検討する。患者サンプルから分離したCTCも増殖抑制状態、抗癌剤耐性を示すかどうか検討を行う。また、PCR法、ウエスタンブロッティング法を用いて、各種増殖マーカー、転移マーカー、間葉系マーカー、上皮系マーカーを測定する。その中で、BM-DTCと共通の性質を呈する細胞の有無を検討する。さらにマイクロアレイ解析を行い、CTCとBM-DTCsの共通点を検討し、CTCの中から、骨髄へ生着可能な細胞が選別されるために必要な因子の検討を行う。上記において、CTCとBM-DTCの共通点が認められない場合は、OSCC患者に同意を取り骨髄穿刺を施行し、骨髄DTCを分離し、検討を行う。しかしながら骨髄穿刺が必要なためすでにサンプルがあり包括同意を取得している血中のCTCの方からアプローチしていく。

4. 研究成果

骨髄環境が癌の再発転移に大きく関連する癌の休眠状態や抗がん剤耐性に深く関わっていることを解明するために、骨髄嗜好株であるBM-DTC株(BM-HEp3)及び肺嗜好株であるLu-DTC株(Lu-HEp3)を用いて解析を行った。BM-DTC株は、増殖抑制状態であり抗癌剤耐性を有していることが判明しており、そのような悪性形質が癌幹細胞に近い性質ではないかと考え、癌幹細胞系マーカーやその他マーカーをリアルタイムPCRにて検討し、Sphere assay法、ALDH活性酵素測定によって、BM-DTC株が癌幹細胞形質を有した細胞であるのかを検討したが、明らかな幹細胞の特性は認めなかった。このことから骨髄播種癌細胞は今まで報告されている癌幹細胞とそのメカニズムとは違った性質を持っている細胞集団で細胞周期静止状態維持や抗がん剤耐性に関与していると思われる。続いて、各嗜好株と原発巣から採取したP-HEp3を用いて行ったマイクロアレイ解析の結果をもとに、BM-DTCsの発現プロファイルが、乳がんのエストロゲン陽性タイプの乳がんや乳がんの骨再発巣と非常に似た発現プロファイルを示したことから、エストロゲンレセプター阻害剤を用いることによってBM-DTCsにおける静止期維持や抗癌剤耐性といった性質がどのように変動するか検討をおこなったが、大きな変動は認めなかったことから、少なくとも単独では関与していないことが判明した。現在他の因子も含めて検討中である。

原発巣の中に含まれる細胞集団の中で、CXCR4及びTGF- β 2の発現が高い細胞群が骨髄に播種されやすいか検討するためにP-HEp3にCXCR4やTGF- β 2を添加したところ、CXCR4では変化なかったが、TGF- β 2に

て増殖抑制状態を示し、抗癌剤抵抗性を示し、BM-HEp3 と同じような性質を示した。TGF- β 2 が骨髄播種細胞の骨髄での休眠状態の維持と抗癌剤耐性に大きく関与していることがわかった。

直接骨髄内に BM-HEp3 を移植し、生着可能かどうか、肺に転移を成立させるのかどうかを P-HEp3 と比較しながら検討を試みた。マウス大腿骨内に直接 HEp3 細胞の移植を行い、数週間後に、肺に転移した細胞の数、または骨髄に生着している細胞の数を検討したが、どちらも認めなかった。

骨髄環境で癌細胞が生存するためには、高 Src 活性を有することが重要であることが報告されているが、3 株の Src 活性を調べたところ、BM-HEp3 においてのみ Src 活性が亢進していた。また、Src 阻害剤であるダサチニブを用いたところ BM-HEp3 においてのみ細胞生存能が著しく低下した。これらの結果から BM-HEp3 は骨髄環境での生存に適した Src 活性が亢進した細胞集団が選別されている可能性が示唆された。

患者血液サンプルからの Circulated tumor cells(CTC)の分離について様々な適した方法を検討したが分離が難しいため、テロメスキャンという方法での分離を 外注することで実施することとし現在詳細を検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 前城 学、休眠骨髄播種癌細胞の分子学的特性
第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜、神奈川県
2. 前城 学、休眠骨髄播種癌細胞における自律的抗癌剤耐性機構
第 56 回日本臨床化学会年次学術集会 2016 年 12 月 2-4 日 くまもと県民交流館 パレア、熊本県
3. 前城 学、休眠骨髄播種癌細胞の自律的分子特性
第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28-30 日 パシフィコ横浜、神奈川県
4. 前城 学 休眠骨髄播種癌細胞の分子学的特性
第 62 回 日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年 10 月 20 -22 日 国立京都国際会館、京都

〔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

中村 拓哉 (NAKAMURA, Takuya)
熊本大学・医学部付属病院
非常勤診療医師
研究者番号：80761212

(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

松井 啓隆 (MATSUI, Hirotaka)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：60379849

神力 悟 (SHINRIKI, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・
准教授

研究者番号：00583048