

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17251

研究課題名(和文) CD133陽性・陰性口腔癌細胞の細胞接着分子の発現差異とそれを標的とした診断治療

研究課題名(英文) Differential expression of cell adhesion molecule of CD133-positive / negative cells derived from oral cancer cell line and diagnostic treatment targeting it

研究代表者

坂上 泰士 (SAKAUE, TAISHI)

広島大学・病院(歯)・病院助教

研究者番号：00735160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：無血清浮遊培養系にて口腔癌由来CD133陽性細胞はsphere形成能を有したが、陰性細胞は形成しなかった。しかしCD133陰性細胞は培養開始時に陽性細胞を加えるとsphere形成能を獲得した。CD133陽性細胞を含むsphere形成細胞は、in vivoにて造腫瘍能を示した。さらにインテグリン α v β 8は口腔癌細胞の運動能を促進させ、 α 8蛋白の安定発現には α vとの二量体形成が必須であった。以上の結果より、CD133陽性細胞は口腔癌幹細胞としての特性を有し、 α v β 8発現が口腔癌の浸潤能に関与する可能性が考えられた。したがって、口腔癌治療においてこれらを標的とした診断治療の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、無血清浮遊培養系にて口腔癌由来CD133陽性細胞はsphere形成能を有した。CD133陽性細胞を含むsphere形成細胞は、in vivoにて造腫瘍能を示した。さらにインテグリン α v β 8は口腔癌細胞の運動能を促進させ、 α 8蛋白の安定発現には α vとの二量体形成が必須であった。以上の結果より、CD133陽性細胞は口腔癌幹細胞としての特性を有し、 α v β 8発現が口腔癌の浸潤能に関与する可能性が考えられた。したがって、口腔癌治療においてこれらを標的とした診断治療の有用性が示唆され、より特異性の高い口腔癌の診断法や治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：CD133-positive cells derived from oral cancer cell line have an ability to form sphere in serum-free suspension culture but not CD133-negative cells. However, sphere formation ability was acquired by adding CD133-positive cells to CD133-negative cells at the start of culture. Sphere forming cells containing CD133-positive cells exhibited tumorigenicity in vivo. In addition, integrin α v β 8 promoted the motility of oral squamous cell carcinoma cells and the dimer formation with integrin α v was essential for stable expression of integrin α 8 protein. These results suggested that CD133-positive cells might have characteristics of oral cancer stem cells and that the expression of integrin α v β 8 might be involved in the invasive potential of oral cancer. Thus, diagnosis and therapy targeted to CD133-positive cells and/or integrin α v β 8 might be useful for oral cancer therapy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 細胞接着分子 インテグリン CD133

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

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は癌の発生・進展のみならず再発、転移および治療抵抗性にも深く関与しており、種々の癌において癌幹細胞が報告されており、癌治療における新たな標的細胞として注目されている。癌幹細胞の表面マーカーとして様々な分子が検討されており、口腔の癌幹細胞マーカーとして、これまで CD44, ALDH1, CD133, Hoechst33342 の side population など報告されているが、全ての口腔癌に共通するマーカーは見つかっていない。口腔癌幹細胞マーカーとして、大腸癌、脳腫瘍、肝細胞癌、肺癌および前立腺癌の癌幹細胞マーカーの有力な候補と考えられている CD133 に着目した。

また、癌幹細胞では ABC トランスポーターなどの薬剤耐性遺伝子の発現が亢進しているだけでなく、インテグリンやケモカインレセプター等の癌の浸潤・転移に関与する分子の発現も亢進していることが報告されている (Giulia Bettolini. et al, 2009)。

インテグリンは、サブユニットとサブユニットからなるヘテロ二量体の膜貫通型の糖タンパク質である。インテグリンの細胞外ドメインは細胞外基質蛋白と結合し、細胞内ドメインはテーリン、 α -アクチニンやアクチンフィラメントなど種々の細胞骨格蛋白と結合している(図1)。さらにインテグリンは、自らはチロシンキナーゼ活性を持たないものの、細胞外基質蛋白との結合により、鎖の細胞内ドメインに結合した focal adhesion kinase(FAK)を活性化し、様々なシグナル伝達をすることが知られている。このように、インテグリンは単に細胞と細胞外基質蛋白との接着分子として機能しているだけでなく、細胞の形態、運動、増殖や分化に関連したシグナル伝達を調節し、器官発生や組織分化においても重要な役割を担っている。

悪性腫瘍において、様々なインテグリン発現と、浸潤・転移や予後との関連性が指摘されている。インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ は、がん細胞の運動能を調整していることや、 $\alpha 3 \beta 1$ のアンタゴニストが、がん細胞のアポトーシスを誘導し、増殖を抑制することが知られている。このように、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ は、がんの増殖や浸潤・転移を調節し、がん進展において重要な役割を担っていると考えられている。本研究代表者の所属する研究室では、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ を介して口腔扁平上皮癌細胞の増殖能及び運動能を調節するシグナルが伝達されていることを明らかにしてきた。しかし、口腔癌由来 CD133 陽性・陰性細胞における細胞接着分子であるインテグリンの発現・機能についてはまだ不明な点が多い。

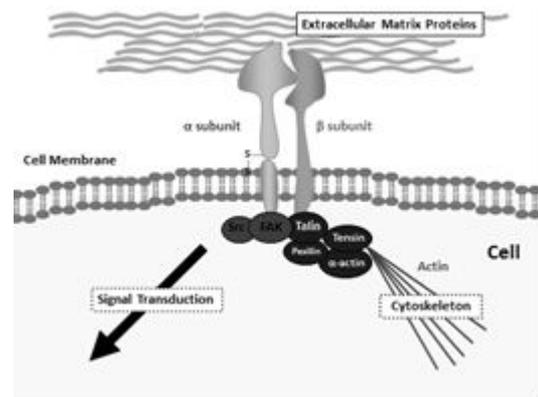


図1

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株由来 CD133 陽性細胞の癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性について検討するとともに、CD133 陽性・陰性口腔癌細胞の細胞接着分子の発現・機能を明らかにし、口腔癌に対する新たな診断・治療標的を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株からの CD133 陽性および陰性細胞の分離。

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株をマグネティックビーズ付き抗 CD133 抗体で処理後、autoMACS (Miltenyi) を用いて CD133 陽性細胞を分離する。また、磁気カラムに吸着しない溶出画分を CD133 陰性細胞とする。各細胞の CD133 蛋白の発現を免疫組織学的に検討し、本分離方法により CD133 陽性細胞が再現性よく分離されていることを確認する。

(2) 無血清単層培養系における CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞の増殖能の比較検討。

型コラーゲンコートした培養皿に各細胞を加え、無血清単層培養を行い、細胞増殖能と細胞形態を検討した。

(3) 無血清浮遊培養系における口腔癌由来 CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞の sphere 形成能の比較

各細胞の無血清浮遊培養を行い、浮遊細胞塊 (sphere) 形成能を比較検討した。

(4) 無血清浮遊培養系における CD133 陰性細胞の sphere 形成能に及ぼす CD133 陽性細胞の影響

CD133 陰性細胞に陽性細胞を各割合になるように加え、浮遊培養し sphere 形成能を検討した。

(5) in vivo における口腔癌由来 CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞の造腫瘍能の比較

CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞を各々浮遊培養後、ヌードマウスの背部皮下に接種し、形成された腫瘍の体積を算定し造腫瘍能を解析する。

(6) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の発現

各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の発現を RT-PCR 法、Western blot 法にて解析する。

(7) テトラサイクリン発現誘導システムを用いたインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の一過性発現系の構築

口腔癌由来 CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ の役割について明らかにするため、まずインテグリン $\alpha 8$ 蛋白の一過性発現のために、口腔扁平上皮癌細胞に T-REx™ System (Life Technologies Corporation) にてテトラサイクリン (Tet) 発現誘導システムを構築する。すなわち、テトラサイクリン誘導性発現プラスミド pcDNA4/TO- $\alpha 8$ cDNA (すでにクローニング済) を組み込んだ pcDNA4/TO- $\alpha 8$ を作製し、Tet リプレッサ-発現ベクター-pcDNA6/TR とともに、口腔扁平上皮癌細胞に導入し、SCC-8TO を分離する。さらに、インテグリン $\alpha 8$ 発現ベクター-pCI-neo/ $\alpha 8$ を構築し、pCI-neo または pCI-neo/ $\alpha 8$ を SCC-8TO へ遺伝子導入し、SCCmock/8TO または SCC $\alpha 8$ /8TO を作製する。Tet 存在下 (1 μ g/ml) で無血清培養した SCCmock/8TO と SCC $\alpha 8$ /8TO の $\alpha 8$ と $\beta 1$ の遺伝子および蛋白発現の継時的変化を RT-PCR 法および Western blot 法にて解析する。さらに、インテグリン $\alpha 8$ 蛋白の安定化に及ぼす $\alpha 8$ の影響を検討した。(8)インテグリン $\alpha 8$ 発現が扁平上皮癌細胞の運動能に及ぼす影響

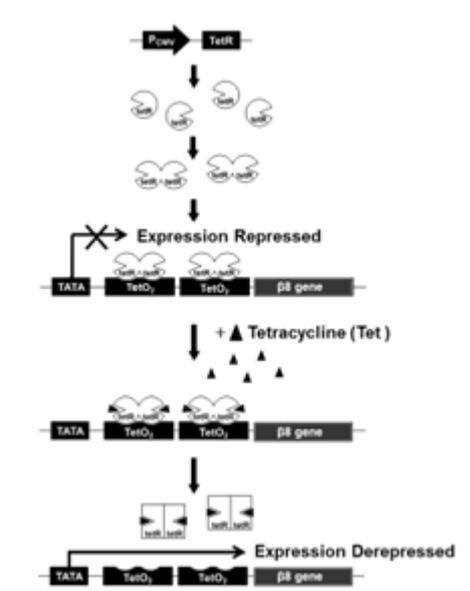


図 2

各細胞を Tet 存在下あるいは非存在下で、各種細胞外基質蛋白上での SCC $\alpha 8$ TO の運動能を Boyden Chamber の変法にて検討した。

4. 研究成果

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株から CD133 陽性細胞を分離した。CD133 蛋白の発現を免疫組織学的に検討し、本分離方法により CD133 陽性細胞が再現性よく分離され、さらに CD133 陽性細胞の全細胞中に占める細胞数の比率はわずか約 0.5%であったことを明らかにした。無血清単層培養系では、CD133 陽性細胞の増殖能は陰性細胞と比較し低下していた。一方、無血清浮遊培養系では、CD133 陽性細胞は、細胞が凝集し sphere を形成したが、CD133 陰性細胞は形成できなかった。しかし培養開始時に、CD133 陰性細胞に CD133 陽性細胞を加えることで sphere 形成能を獲得し、その大きさや数は、CD133 陽性細胞の割合が 0.5%でほぼプラトーに達した。CD133 陽性細胞を含む sphere 形成細胞はヌードマウス背部皮下に腫瘍を形成したが、CD133 陰性細胞のみでは腫瘍は形成できなかった。

さらに、一部の口腔扁平上皮癌細胞株はインテグリン $\alpha 8$ を高発現していた。そこで口腔癌由来 CD133 陽性・陰性細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ の役割について明らかにするために、Tet 発現誘導システムを用いてインテグリン $\alpha 8$ 蛋白の一過性発現系を構築した。SCCmock/8TO または SCC $\alpha 8$ /8TO を Tet 非存在下または存在下で培養し、 $\alpha 8$ 蛋白発現を検討した結果、いずれの細胞も、Tet 処理により、 $\alpha 8$ 蛋白発現が誘導された。SCCmock/8TO または SCC $\alpha 8$ /8TO を Tet 存在下で 24 時間培養した後、さらに Tet 非存在下で各時間培養した時の $\alpha 8$ 蛋白発現を解析した。Tet 非存在下で培養を続けることにより、SCCmock/8TO では、 $\alpha 8$ 蛋白は経時的に発現が低下し、12 時間後にはほぼ消失した。これに対し、SCC $\alpha 8$ /8TO では、Tet 非存在下で 24 時間培養しても $\alpha 8$ 蛋白発現が維持された。その際、共免疫沈降法にて $\alpha 8$ の二量体形成が確認された。よって、 $\alpha 8$ 蛋白の安定発現には、 $\alpha 8$ との二量体形成が必須であることが示唆された。さらに Tet 存在下あるいは非存在下で、各種細胞外基質蛋白上での SCC $\alpha 8$ TO の運動能を Boyden Chamber の変法にて検討した。Tet 処理により、 $\alpha 8$ 蛋白発現が誘導された $\alpha 8$ 発現細胞は、ラミニン以外の細胞外基質蛋白上での細胞遊走能が亢進した。インテグリン $\alpha 8$ は口腔癌細胞の運動能を促進することで、がん浸潤の亢進に関与していることが示唆された。

これらの結果より、CD133 陽性細胞は口腔癌幹細胞としての特性を有し、インテグリン $\alpha 8$ の発現が口腔癌の浸潤能に関与している可能性が示唆された。したがって、口腔癌治療においてこれらを標的とした診断治療の有用性が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

坂上泰士, 吉岡幸男, 松井健作, 津島康司, 大林史誠, 濱田充子, 山崎佐知子, 浜名智昭, 角健作, 神田拓, 小泉浩一, 谷亮治, 林堂安貴, 笹原妃佐子, 伊藤翼, 佐渡友浩, 石田康隆, 岡本康正, 小林雅史, 坂本哲彦, 明見能成, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 90 歳以上の超高齢口腔がん患者の臨床的検討, 日本口腔科学会雑誌, 査読有, 68(1):12-19, 2019.

吉岡幸男, 坂上泰士, 松井健作, 津島康司, 大林史誠, 濱田充子, 山崎佐知子, 浜名智昭, 角健作, 神田拓, 小泉浩一, 谷亮治, 林堂安貴, 笹原妃佐子, 伊藤翼, 佐渡友浩, 石田康

隆,岡本康正,小林雅史,坂本哲彦,明見能成,虎谷茂昭,岡本哲治, Adolescent and Young Adult(AYA)世代(における)口腔がんの臨床的検討,日本口腔科学会雑誌, 査読有, 68(1): 20-27、2019.

津島康司,林堂安貴,坂上泰士,松岡美玲,櫻井 繁,岡本哲治, 口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における HDM2 の機能解析, 口腔組織培養学会誌, 査読無, 26(1): 7-8、2017.

[学会発表](計8件)

Taishi Sakaue, Yukio Yoshioka, Fumitaka Obayashi, Kouji Tsushima, Kensaku Matui, Atsuko Hamada, Sachiko Yamasaki, Tomoaki Hamana, Kensaku Sumi, Taku Kanda, Koichi Koizumi, Ryouji Tani, Yasutaka Hayashido, Hisako Sasahara, Shigeaki Toratani, Tetsuji Okamoto, A clinical study of super elderly patients over 90 years old with oral cancer, 第51回広島大学歯学会総会, 2018年6月9日, 広島

Yukio Yoshioka, Kensaku Matui, Taishi Sakaue, Fumitaka Obayashi, Kouji Tsushima, Atsuko Hamada, Sachiko Yamasaki, Tomoaki Hamana, Kensaku Sumi, Taku Kanda, Koichi Koizumi, Ryouji Tani, Yasutaka Hayashido, Hisako Sasahara, Shigeaki Toratani, Tetsuji Okamoto, A clinical study on Adolescent and Young Adult (AYA) patients with oral cancer, 第51回広島大学歯学会総会, 2018年6月9日, 広島

坂上泰士, 吉岡幸男, 大林史誠, 津島康司, 松井健作, 濱田充子, 山崎佐知子, 浜名智昭, 角健作, 神田拓, 小泉浩一, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 当科における90歳以上の超高齢者口腔がん患者の検討, 第72回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2018年5月13日, 名古屋

吉岡幸男, 坂上泰士, 松井健作, 大林史誠, 津島康司, 濱田充子, 山崎佐知子, 浜名智昭, 角健作, 神田拓, 小泉浩一, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 当科における AYA (思春期・若年成人) 世代口腔がん患者の検討, 第72回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2018年5月13日, 名古屋

大林史誠, 坂上泰士, 小泉浩一, 吉岡幸男, 小川郁子, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 原発性下顎骨中心性扁平上皮癌と頸部原発ホジキンリンパ腫の同時性重複癌の1例, 第65回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2017年11月11日, 高知

松岡美玲, 吉岡幸男, 鷹津冬良, 廣田 傑, 坂上泰士, 山崎佐知子, 浜名智昭, 神田 拓, 角 健作, 小泉浩一, 谷 亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 超高齢口腔がん患者の臨床病態の検討, 第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017年4月27日, 愛媛
櫻井 繁, 林堂安貴, 吉岡幸男, 浜名智昭, 坂上泰士, 松岡美玲, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌における focal adhesion kinase (FAK) 及びリン酸化 FAK の発現と臨床病態に関する研究, 第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017年4月27日, 愛媛

津島康司, 林堂安貴, 坂上泰士, 松岡美玲, 櫻井 繁, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌の浸潤における HDM2 の機能解析, 第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017年4月27日, 愛媛

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。