

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06299・19K21387

研究課題名(和文) リプログラミング技術を用いた口腔扁平上皮癌幹細胞の特性分子探索

研究課題名(英文) A search for the characteristic molecules of oral squamous cell carcinoma stem cells using reprogramming technic.

研究代表者

平島 寛司 (Hirashima, Kanji)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：50824661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔扁平上皮癌(OSCC)の癌幹細胞の特性分子を明らかにすることを目的に、まずはiPS細胞作製に用いるリプログラミング技術によってOSCC細胞の分化段階を巻き戻し、癌幹細胞様の細胞の作出を行った。歯肉癌、舌癌、口底癌由来の3株は、リプログラミング直後に癌幹細胞マーカーであるCD133やALDH1等の一過性発現上昇が認められたが、この細胞集団を解析するのに十分な期間、培養することが不可能であった。この問題を解決するため、リプログラミング口腔癌細胞株中のTra-1-60陽性細胞を分取して継続培養することで、リプログラミング直後の性質を保持したまま、長期間培養する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってリプログラミング口腔癌細胞を継続培養する手法を確立できたことは、今後の口腔癌幹細胞研究のみならず扁平上皮がんに対する治療標的分子の探索に、学術的に大きな意義がある。また、進行がんの根治が困難な主な原因は転移と再発であり、自己増殖能、多分化能、薬剤耐性能を持ったがん幹細胞(CSC)を対象とする研究が盛んに行われているが、今なお多くのがんにおいてCSCは未同定である。本研究の成果によって、人工的に作り出したCSC様細胞を詳細に解析し、実在のCSCの性質を予測する研究を発展させることができ、CSCを標的としたがん治療法の開発に向け、社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the molecules of oral squamous cell carcinoma stem cells. To generate CSC-like cells in vitro, we transduced four previously established reprogramming factors, Oct3/4, Sox2, Klf4, and L-myc, into the oral squamous cell carcinoma cell lines HSC-3-M3, KON and Ca9-22. CSC markers such as CD133 and ALDH1 expression were upregulated after reprogramming, but did not show CSC properties, including colony formation, maintenance of colonies by repeated passages. To overcome these problems, Tra-1-60+ cells were obtained from reprogrammed cells, and showed CSC properties, including colony formation, maintenance of colonies by repeated passages, as well as increased expressions of CSC markers such as CD90/Thy-1 and CD44. Our results show that reprogramming of oral cancer cells produced not pluripotent stem cells but CSC-like cells, and these findings will provide biological information about genuine CSCs and help establish new CSC-targeted therapies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞 リプログラミング iPS細胞 口腔扁平上皮癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1981 年以来死因のトップの座にある悪性腫瘍 (癌、肉腫等)は、我が国においても罹患者数が 100 万人を既に超え、国民のおよそ 2 人に 1 人が生涯の間に罹患する“ありふれた疾患”である。診断・治療法の進歩によって一部の症例では治癒を期待できつつあるにもかかわらず、進行・転移・再発症例に対する治療成績はここ数十年目立った進歩がないために、2017 年においてなお年間 37 万 8 千人もの死者を数える深刻な疾患である。口腔癌は全悪性腫瘍の 1%を占めるとされるが、他の癌と同様に転移・再発症例の治療成績の向上なくして、口腔癌克服は実現し得ないことは明白である。

転移・再発の原因として、癌組織中に極めて少数存在する癌幹細胞の存在が注目されている。癌幹細胞は自己複製能や薬剤耐性能を持つ、組織幹細胞や ES/iPS 細胞と性状の似た細胞である。極めて少数から腫瘍組織を構築する能力を持つことから、癌の根治には癌幹細胞の撲滅が不可欠であり、重要な治療標的として多くの研究が行われている。しかし癌幹細胞は、その稀少性から“探し出す”ことが非常に困難であり、今なお多くの癌種において未解明の点が多い。我々は“癌幹細胞とは?”という「問い」に対し、癌組織を構築できる能力を有する癌幹細胞と類似の細胞を人工的に“作り出す”アプローチで答えを導き出せると考え、まずは iPS 細胞作製手法である“リプログラミング”によって、癌細胞の分化段階を巻き戻し、各々が癌幹細胞であった頃の細胞特性を明らかにすることを試みた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔扁平上皮癌(OSCC)の癌幹細胞を標的とした治療の実現に向け、リプログラミング技術によって OSCC 細胞の分化段階を巻き戻し、細胞の特性分子による選別によって、人工的に癌幹細胞様の細胞 (人工癌幹細胞) を作製し、口腔癌幹細胞の治療標的となりうる特性分子の探索を行うことである。そのために、リプログラミングによって作出した“人工癌幹細胞”ともいふべき、未分化・癌幹細胞マーカー分子の発現上昇を認める OSCC 細胞由来の細胞集団の遺伝子発現パターンや細胞膜電位等を解析し、“本物の”癌幹細胞の特性分子を見出すことを試みる。次に、作成した人工癌幹細胞を免疫不全動物に移植し、腫瘍形成能や形成された腫瘍の病理学的評価を行う。また、人工癌幹細胞様細胞を *in vitro* で分化させることで OSCC の各段階を再現し、段階的プロセスを経て癌組織が形成される過程を精査する。これらを総合的に評価し、OSCC 幹細胞の治療標的分子を明らかにすることが最終目標である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用した口腔扁平上皮癌細胞株

HSC-3-M3(舌癌), KON(口底癌), Ca9-22(歯肉癌)

#### (2) リプログラミング法

センダイウイルスベクターを用いた iPS 細胞作製キットを用いて、口腔癌細胞株 3 種類に対してリプログラミングを行った。ベクター感染 7 日後にフィーダー細胞(マウス胎児由来線維芽細胞)上へ播種を行い、ES/iPS 細胞用培地を用いて培養を行った。

#### (3) リプログラミング細胞の評価

Real time-PCR による各種癌幹細胞・未分化細胞マーカーの評価

CD133, CD44, CD24, ALDH1 等既知の癌幹細胞マーカー、Nanog, Oct3/4 等の未分化マーカー、Snail, ZEB1 等の上皮間葉転換(EMT)マーカーの発現解析を行った。対照としてリプログラミング前の口腔癌細胞株のほか、ヒト iPS 細胞株である 201B7 株および 253G1 株の遺伝子発現パターンのデータを用いた。

蛍光免疫染色による各種癌幹細胞・未分化細胞マーカーの評価

CD133, CD44, CD24, ALDH1, Nanog, Oct3/4, CD90/Thy-1, Decorin の発現を検討した。

薬剤耐性能評価

1  $\mu$ g または 50  $\mu$ g の 5-FU 処理を 48 時間行い、細胞の生存率を MTT アッセイにて評価した。

#### (4) 癌幹細胞様細胞の継続培養

ES/iPS 細胞様コロニーの pick up による継代培養

研究代表者らのグループが膵臓癌および大腸癌幹細胞に関する先行研究において確立した手法で、ES/iPS 細胞様コロニーを顕微鏡下でマーキングして pick up する方法である。リプログラミング口腔癌幹細胞はほとんどコロニーを形成しなかったため、この手法を試行するに至った。

磁気細胞分離装置(MACS)による Tra-1-60 陽性細胞の分取による継代培養

リプログラミング口腔癌細胞をトリプシンにて単細胞化し、Tra-1-60 陽性細胞を MACS で分取する。得られた Tra-1-60 陽性細胞を ROCK 阻害剤存在下でフィーダー細胞上へ播種し、翌日以降は ES/iPS 用培地を 2 日に 1 回交換する。

#### 4. 研究成果

##### 口腔癌細胞株のリプログラミング

本研究では、研究代表者らが<sup>1</sup>大腸癌細胞において確立した方法を<sup>1</sup>を改変して用いることで、3種類の口腔癌細胞株であるCa-9-22(歯肉癌)株・HSC-3-M3(舌癌)株・KON(口底癌)株に対してリプログラミングを行った。次にリプログラミング口腔癌細胞株から、発現上昇を認める未分化・癌幹細胞マーカー分子の発現量の測定を行った。3種の口腔癌細胞株はいずれもリプログラミング直後にCD133やALDH1等の

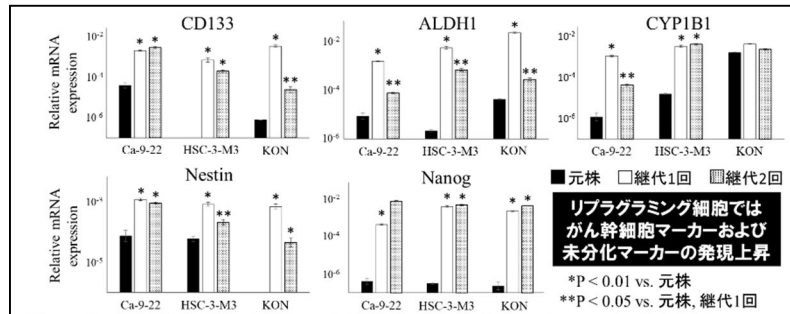


図1 リプログラミングによる癌幹細胞・未分化マーカーの発現上昇

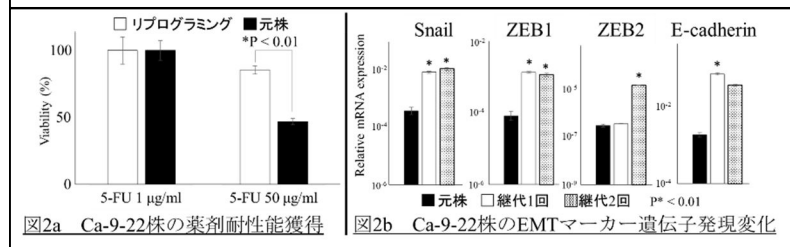


図2a Ca-9-22株の薬剤耐性能獲得

図2b Ca-9-22株のEMTマーカー遺伝子発現変化

発現上昇を認めたものの、培養を継続する過程でそれらの発現は徐々に低下し、リプログラミング前の形態へと戻った(図1)。なかでも、リプログラミングCa-9-22(歯肉癌)株は、5-FUに対する有意な薬剤耐性能を獲得し、一部のEMTマーカー(Snail, ZEB1, ZEB2, E-cadherin)の発現上昇を認めた(図2a, b)。口腔扁平上皮癌は分化傾向が強いことが知られており、リプログラミングによる分化段階の巻き戻しが困難であることは想定範囲内であり、リプログラミング直後の状態を長期間維持できるような培養方法の開発を試みた。

##### 癌幹細胞様細胞の長期培養法の開発

リプログラミング直後にみられる、癌幹細胞・未分化マーカー陽性細胞の長期培養法を検討するにあたり、リプログラミング直後に発現が上昇し、培養を継続する過程で発現が低下する分子によるセレクションを試みた結果、Tra-1-60陽性細胞を磁気細胞分離装置(MACS)によって分離・継代し、フィーダー細胞上で継続培養する手法を考案した(図3a)。継代のたびにMACSでTra-1-60陽性細胞を分離することで、コロニー形成がみられる細胞集団を得た(図3b)。この細胞集団は、リプログラミング前の細胞や、Tra-1-60

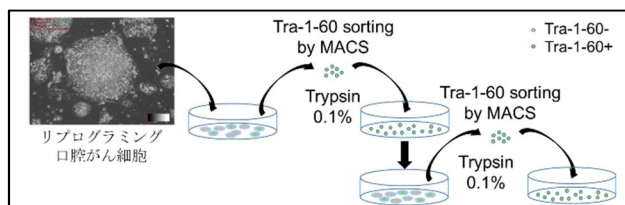


図3a リプログラミング口腔癌細胞からの癌幹細胞様細胞の抽出

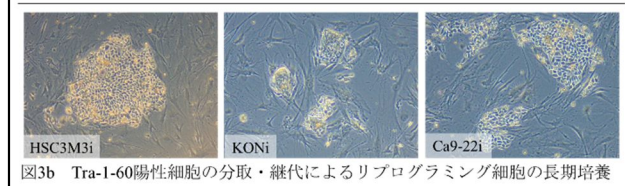


図3b Tra-1-60陽性細胞の分取・継代によるリプログラミング細胞の長期培養

陰性細胞と比較して著しく細胞増殖能が低く、10~14日に1回の頻度で継代を行った。さらにTra-1-60陽性細胞は、Tra-1-60陰性細胞と比較してCD90/Thy-1およびCD24が高発現しており、その発現量は、未分化細胞であるヒトiPS細胞の201B7株や253G1株と同等であった(図4)。

リプログラミング細胞から単離した、癌幹細胞様細胞の長期培養法の確立に時間を要し、この細胞に対する詳細な解析は事業期間終了後に行うこととなったが、リプログラミング細胞集団中にみられる薬剤耐性能を持つ細胞集団を、免疫不全動物に移植することで腫瘍形成能を評価したり、免疫不全動物に対する細胞移植によって形成された腫瘍の病理学的評価を行ったり、癌オルガノイドやスフェ

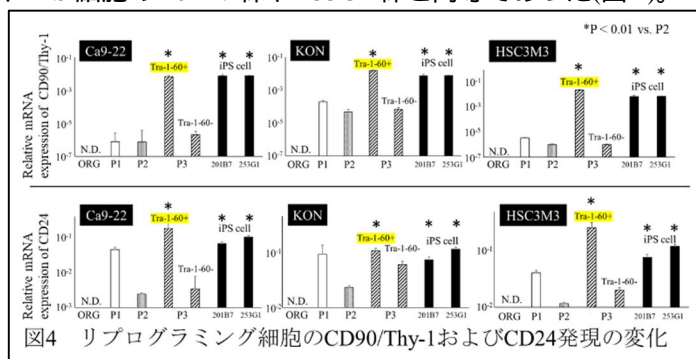


図4 リプログラミング細胞のCD90/Thy-1およびCD24発現の変化

ロイド形成などの3次元培養法を含めた、in vitroでの分化誘導試験による腫瘍組織形成過程の再現を試み、最終的にはOSCC幹細胞に対する治療標的分子を明らかにしたいと考えている。

【参考文献】[1] Hirashima K. et al. 「Cell biological profiling of reprogrammed cancer stem cell-like colon cancer cells maintained in culture」 Cell Tissue Res. 2019 Mar;375(3):697-707.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平島 寛司、齋藤 敦史、宮坂 彩子、澤野 和生、佐藤 住美江、高田 清美、池田 利恵、菊池 憲一郎
2. 発表標題 リプログラミングによる口腔がん幹細胞様細胞の作製と評価
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----