

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24086

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした口腔がんの放射線増感戦略の基盤構築

研究課題名(英文) Building a foundation for radiation sensitization strategy for oral cancer targeting cancer stem cells

研究代表者

小野里 祐佑 (Onozato, Yusuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10844300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年ではpsf1の発現ががん幹細胞(CSC)で亢進していることが報告され、CSCマーカーとして用いられるようになってきている。そこで報告者はpsf1のpromoterにGFPをつないだ融合タンパク質(psf1pro-GFP)を口腔癌細胞株SASへ導入した。Spheroidモデルおよびヌードマウス皮下腫瘍モデル作成したが、Spheroid外層および腫瘍の血管近傍などpsf1陽性細胞が多く存在すると予測された領域にpsf1陽性細胞の増加は明らかには認めなかった。この結果から口腔癌では、psf1が血管近傍に存在するCSCのマーカーにはならない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なタンパク質が様々な癌種でがん幹細胞(CSC)マーカーとして報告されている。本研究ではpsf1が口腔癌細胞についてCSCマーカーとなり得るか、また放射線感受性に影響を与えるかどうかを検証した。結論として口腔癌では、psf1が血管近傍に存在するがん幹細胞のマーカーにはならない可能性と、放射線感受性には影響を及ぼさない可能性が示唆され、さらなるCSCマーカーの検討の必要性を再認識した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been reported that the expression of psf1 is enhanced in cancer stem cells (CSC), and it has come to be used as a CSC marker. Therefore, the reporter introduced a fusion protein (psf1pro-GFP) in which GFP was linked to the psf1 promoter into the oral cancer cell line SAS. Spheroid models and nude mouse xenografted models were examined, but no increase in psf1-positive cells was clearly observed in areas where many psf1-positive cells were predicted to be present, such as in the outer layer of Spheroid and peri-blood vessels of the tumor. These results suggest that psf1 may not be a CSC marker which present peri-blood vessels in oral cancer.

研究分野：放射線生物学

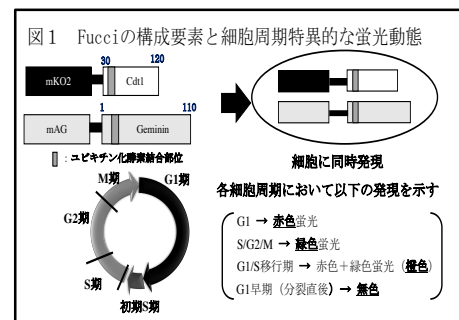
キーワード：口腔癌 がん幹細胞 放射線感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌における放射線治療は、外科療法と比較して非侵襲的であり、生活の質を担保することができるが、外科療法を凌駕するエビデンスは得られておらず、一層の治療効果の向上が期待されている。特に腫瘍内部に存在するがん幹細胞 (CSC) が放射線感受性に関与していると考えられているが、その詳細は不明な点も多く CSC の特性解析が課題となっている。CSC は血管内皮細胞近傍の増殖期分画にも存在し、近年 CSC マーカーとして *psf1* が同定されている。*psf1* は DNA 複製因子である GINS 複合体の一部を構成し、幹細胞の急速な増殖に必須の役割があることが明らかにされている。特に近年では *psf1* の発現が CSC で亢進していることが報告され、CSC マーカーとして用いられるようになってきている。そこで報告者は *psf1* の promoter に GFP をつないだ融合タンパク質 (*psf1*pro-GFP) を口腔癌細胞株へ導入した。

また、報告者はこれまでに Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) (図 1) を導入した口腔癌細胞株を樹立し、Spheroid の外層に存在する増殖期細胞 (緑色蛍光) と内部に存在する静止期細胞 (高度赤色蛍光) 分画とを分離して、それぞれの放射線感受性を求めることに成功し、Spheroid 外層の増殖期細胞の方が放射線抵抗性であることを見出した(Onozato et al., Cancer Sci, 2017)。以上のことから、Spheroid 増殖分画である外層に、放射線抵抗性の CSC が存在しているのではないかと、という仮説を立て、外層の増殖期分画の CSC のマーカーとして *psf1* に着目した。



2. 研究の目的

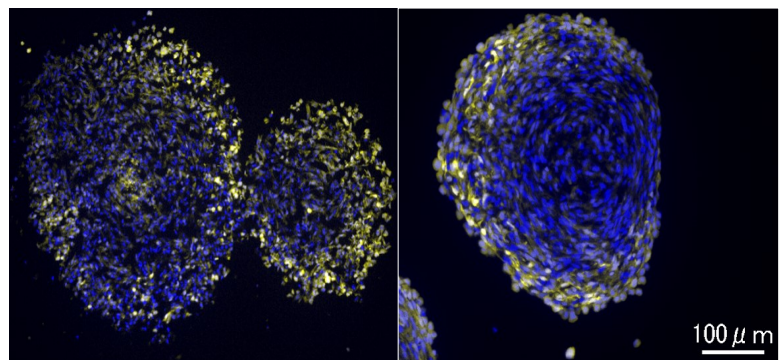
これまでに腫瘍内部の血管内皮細胞近傍領域の CSC を可視化し放射線感受性を解析する研究はなされたことがなく、本研究では腫瘍内部に存在する CSC と非 CSC との放射線感受性を検証し、口腔癌における放射線増感戦略の基盤構築の構築を目指した。

3. 研究の方法

psf1 の promoter に GFP をつないだ融合タンパク質 (*psf1*pro-GFP) を口腔癌細胞株 SAS へ導入した (SAS-*psf1*pro-GFP)。この細胞を使用して Spheroid モデルを作成し、凍結切片および共焦点顕微鏡を用いた live imaging の2つで GFP 陽性細胞の発現を比較した。また、in vivo においては、ヌードマウスに SAS-*psf1*pro-GFP を用いて腫瘍を作成した。X 線 10Gy24 時間と照射群を比較して GFP 陽性細胞の発現を比較した。また CD31 の免疫組織染色を行い、血管近傍の陽性細胞を観察した。

4. 研究成果

初年度は、SCCVII-*psf1*pro-GFP を用いて Spheroid モデルを作成した。約 500 μ m 程度の Spheroid を作成し、凍結切片での観察を行ない、低酸素領域の Spheroid 内層と酸素に富む外層における GFP 陽性細胞を比較した。その結果、Spheroid はがん幹細胞を

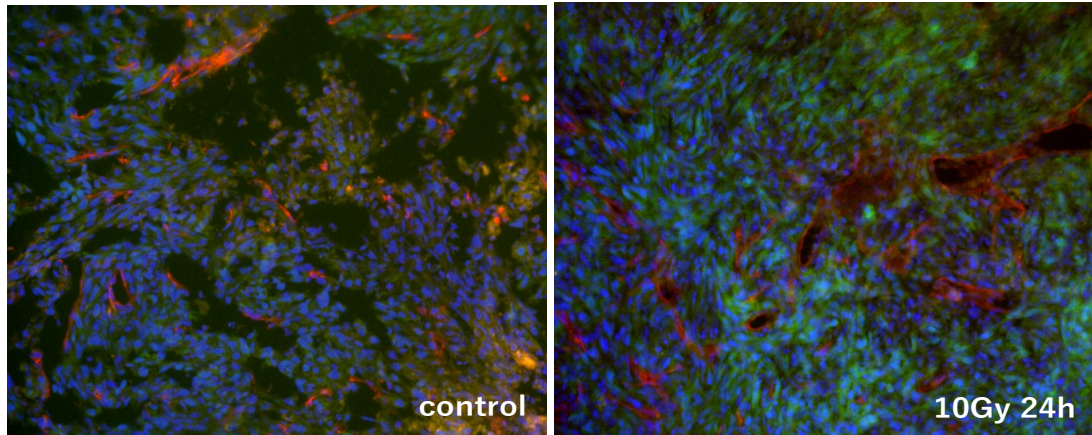


黄色: SCCVII-pro-GFP 青色: Hoechst

図2 SCCVII-*psf1*pro-GFP 陽性 Spheroid 像

enrichできることが知られているが、Spheroid外層にGFP陽性の細胞をやや多く認める傾向にあったものの、内部にも発現を認めるものもあり、最終的には内外の発現量の差は認められなかった（図2）。

次に、ヌードマウスを用いたin vivoの実験を行なった。ヌードマウスの下肢にSCCVII-psf1pro-GFP由来の腫瘍を作成し直径約1cmになった時点でX線10Gyを照射し、24時間後に凍結切片を作成しcontrolとの比較を行った。しかし、予想に反して、非照射群、10Gy照射群共に腫瘍内外に関係なくGFP陽性細胞を認めた。CD31の免疫組織染色を行ったが、



緑色：SCCVII-pro-GFP 赤色：CD31 青色：Hoechst

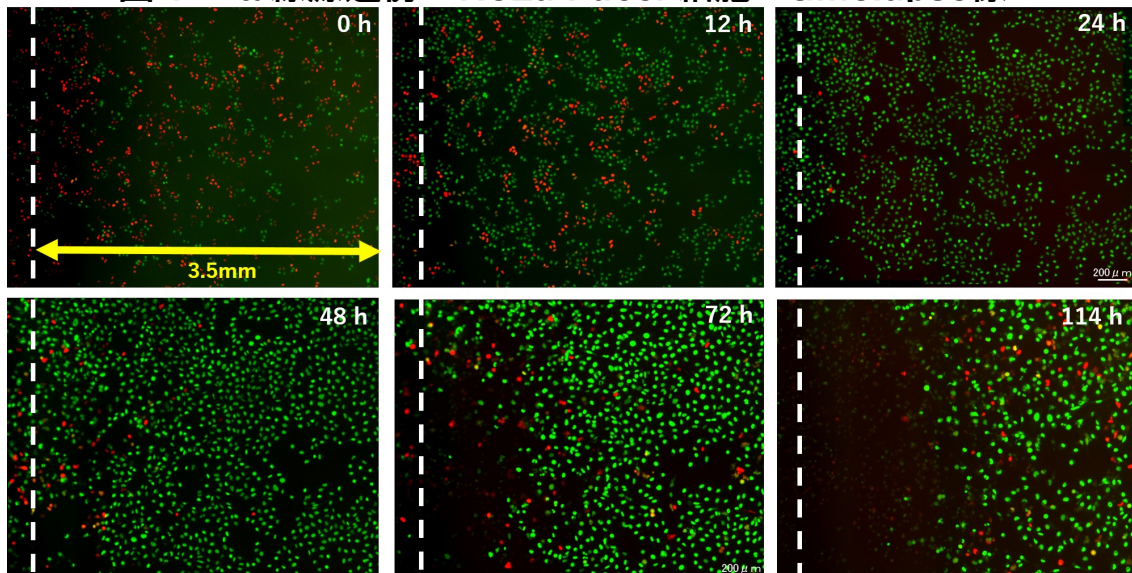
図3 SCCVII-psf1pro-GFP 陽性細胞とCD31陽性細胞

血管近傍で特に発現が高い所見は得られなかった（図3）。

これらの結果から、口腔癌では、psf1が血管近傍に存在するがん幹細胞のマーカーにはならない可能性と、放射線感受性には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

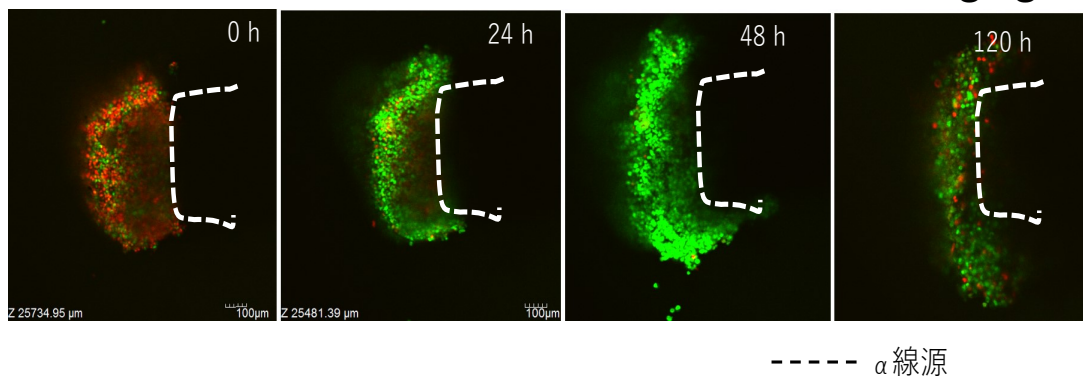
X線に対しては上述した結果であったが、イスラエルで開発されたα線源を用いた小線源治療の治験が私の所属する分野で行われることとなり、その基礎研究としてα線源を利用することが可能になった。そこで2020年度は、α線に対する効果を検討することとした。しかしながら、細胞動態への影響をはじめ、放射線生物学的知見はほとんど得られていないため細胞周期を可視化できるFucciを導入した細胞（Fucci導入HeLa細胞）を用いて、α線源によ

図4 α線源近傍のHeLa Fucci 細胞のtimelapse像



る細胞動態、特にG2アレスト動態の解析を行なった。まず、 α 線源は直径0.7mmの円柱状であるため、作製したリングをディッシュ底面に設置して線源を固定し、タイムラプスイメージングを行なった。その結果、線源設置後24時間で線源周囲の細胞の大半にG2アレストが認められた。その後興味深いことに、線源から離れた細胞群にはG2アレストの持続が見られたが、線源近傍の細胞の大半は死滅した(図4)。 α 線源の治験の前臨床試験から α 線源の腫瘍殺傷効果が明らかになっており、臨床的には線源を5mm間隔で設置することが重要で明らかになっているが(Arazi L. et al., Phys. Med. Biol.,2007)、本実験からも線源からの距離が細胞周期動態に関係していることが分かった。これらの結果を踏まえSpheroidを作製し、共焦点顕微鏡を用いてlive imagingにて観察を行なった。ダミー線源と α 線源を用

図5 α 線源とHeLa Fucci Sフェロイドのlive imaging



いて比較したところ、 α 線源はmonolayerとほぼ同じタイミングでG2アレストのピークを迎え、線源設置後120時間程度でSpheroidの一部崩壊が観察された(図5)。

これによりSpheroidにおいても α 線の殺細胞効果をlive imagingにて検証することができた。報告者が所属する研究室では、放射線照射後にM期を経る時に生じる微小核を検出する技術を有しており、これによって放射線感受性を求めることができる。この技術を利用すれば、 α 線源から放出される α 線に対する放射線感受性を求められるので、今後、psf1の影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------